

Aus der Klinik und Poliklinik
für Frauenheilkunde und Geburtshilfe-Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. K. Frieze)

**Vergleichende Untersuchungen zur Hefepilzbesiedelung von
Mundhöhle und Vagina und Bestimmung
von Interleukin-4, Interleukin-10 und Interleukin-12**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Victor Schardt
aus
München
2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. habil. E.-R. Weissenbacher

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Christina Rieger

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2013

Meinen Eltern Thomas-Peter und Irmgard und meinem Bruder Julian
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	7
1 Einleitung und Fragestellung	9
1.1 Einleitung	9
1.1.1 Die Gattung Candida und Candida spezifische Immunität	9
1.1.2 Die orale und vaginale Candidiasis	11
1.1.2.1 Die orale Candidiasis	11
1.1.2.2 Die vaginale Candidiasis	13
1.1.3 Interleukin-4 (IL-4) und Candidiasis	16
1.1.4 Interleukin-10 (IL-10) und Candidiasis	18
1.1.5 Interleukin-12 (IL-12) und Candidiasis	19
1.2 Fragestellung	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.2 Patientinnengut	22
2.2.1 Patientinnen	22
2.2.2 Pilz-Kultur-Nachweis	25
2.3 DNA-Extraktion	27
2.3.1 Material	27
2.3.2 Durchführung der DNA-Extraktion	28
2.4 DNA-Extraktion mit dem Purgene DNA Purification Kit	30
2.4.1 Material	30
2.4.2 Durchführung der DNA-Extraktion mit dem Purgene DNA Purification Kit	30
2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)	32
2.5.1 Material	32
2.5.2 Durchführung der Polymerasekettenreaktion	32
2.6 Gelelektrophorese	34

2.6.1 Material	34
2.6.2 Durchführung der Gelelektrophorese	35
2.7 Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)	37
2.7.1 Material	37
2.7.2 Interleukin-4 Nachweis	37
2.7.3 Interleukin-10 Nachweis	40
2.7.4 Interleukin-12 Nachweis	41
2.8 Auswertung der Interleukinbestimmung	43
2.9 Statistische Analyse	45
3 Ergebnisse	46
3.1 Patientinnen	46
3.2 Candidanachweis	50
3.2.1 Candidanachweis in den Vaginalproben	50
3.2.2 Candidanachweis in den Mundproben	51
3.3 Auswertung der Zytokinbestimmung mittels ELISA	52
3.3.1 Ergebnisse der Bestimmung von IL-4, IL-10, IL-12 und des Gesamtproteingehaltes	52
3.3.2 Auswertung der Interleukine nach Gruppen	54
3.3.2.1 Vergleich von Gruppe 1 mit 3	57
3.3.2.2 Vergleich von Gruppe 2 mit 3	58
3.3.2.3 Vergleich von Gruppe 1 mit 4	58
3.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Zytokinbestimmung	59
3.4 Auswertung der Zytokinbestimmung mittels ELISA und Normierung auf den Gesamtproteingehalt	61
3.4.1 Vergleich von Gruppe 1 mit 3	63
3.4.2 Vergleich von Gruppe 2 mit 3	64
3.4.3 Vergleich von Gruppe 1 mit 4	64
4 Diskussion	66
5 Zusammenfassung	78

6 Literaturverzeichnis	80
7 Anhang	92
7.1 Geräte	92
7.2 Patientinnenliste	94
8 Danksagung	118
9 Lebenslauf	119

Abkürzungen

Aqua a.i.	Aqua ad iniectabilia
bp	Basenpaare
CRVVC	Chronisch rezidivierende Vulvo- vaginalcandidose
Candida spp.	Candida spezies
CMI	Zellvermittelte Immunität
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL-4	Interleukin-4
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
kDa	kilo Dalton
μ l	Mikroliter
mA	Milliampere
ml	Milliliter
mM	milli Mol
NID-Puffer	Nonionic Detergent Puffer
NK	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NTP (ATP,GTP,TTP,CTP)	Nukleotidtriphosphate (Adenosintri- phosphat, Guanosintriphosphat , Thymidintriphosphat, Cytidintri- phosphat)
OPC	Oropharyngeale Candidiasis

PBS-Puffer	Phosphate-Borate-Saline-Puffer
PCR	Polymerase chain reaction
pg	Pikogramm
PMNL	polymorphkernige Leukozyten
RHG	Reinheitsgrad
RVVC	Rezidivierende vulvovaginale Candidiasis
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrose Faktor
U/m	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VVC	Vulvovaginale Candidose

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Einleitung

1.1.1 Die Gattung Candida und Candida spezifische Immunität

Die Gattung Candida, ein hefeartiger Pilz, der zuerst 1844 im Sputum eines Tuberkulosepatienten isoliert wurde, gehört zur Familie der Deuteromyceten und besteht aus ca. 150 Pilzspezies [11,65].

Die Candida spezies werden am häufigsten am Menschen im Gastrointestinaltrakt, in der Vagina und auf der Haut gefunden, wobei die oropharyngeale Candidiasis (OPC) (s. Abb. 1) und die vulvovaginale Candidiasis (VVC) die zwei häufigsten Formen opportunistischer Pilzinfektionen darstellen [26,46]. In immunkompetenten und in immunsupprimierten Frauen tritt die VVC gleich häufig auf, während die OPC ohne Immunsuppression selten vorkommt.



Abbildung 1: Oropharyngeale Candidiasis [67]

Candida spezies, die sowohl als Kommensale als auch als opportunistische Pathogene der mukosalen Gewebe fungieren, bewirken bei den meisten gesunden Individuen, aufgrund der kommensalen Beziehung, eine Candida spezifische Immunität, die mittels Serumantikörpern, in vitro T-Zellreaktionen und

Hautreaktionstest nachgewiesen werden kann [10,26]. Bisher wurde diese Candida spezifische zelluläre Immunität (CMI), die aus einem frühen kommensalen Kontakt entsteht, als hauptsächlicher Schutzmechanismus des Menschen angenommen [85].

Die angeborene Immunabwehr, insbesondere polymorphkernige Leukozyten (PMNL) und Makrophagen, dominiert die Abwehr systemischer Candida-infektionen. Dagegen schützt die zelluläre Immunabwehr über T-Zellen und Zytokine die Schleimhautgewebe [26].

Die erworbene Immunabwehr gegen eine Candidainfektion resultiert aus der Entwicklung einer T-Helferzellen 1 (Th1)–Immunantwort, deren Th1-Zell-Zytokine die phagozytierenden Zellen gegen Candidiasis aktivieren. Th2-Zell-Zytokine ihrerseits hemmen die Th1-Zellentwicklung und führen zu einer Deaktivierung der phagozytierenden Zellen [79]. Daher wurde ein Infektionsschutz mit einer Th1-Antwort in Verbindung gebracht, die Th2-Antwort hingegen sollte zu einer Infektionsanfälligkeit führen [85].

Die bisherigen klinischen und experimentellen Beobachtungen ließen auf eine wichtige Rolle der lokalen Immunantwort schließen, da aufgrund einer Candida-infektion von oralen und vaginalen Epithelzellen ganz spezielle Zytokine produziert werden [97]. Eine schützende Th1-Antwort sollte so ein Zusammenspiel aus IFN-gamma, TGF-beta, IL-6, TNF-alpha und IL-12 erfordern, unter einem gleichzeitigen Mangel der Zytokine IL-4 und IL-10 [100].

Seit kurzem hat allerdings ein Paradigmenwechsel im Verständnis der Immunabwehr gegen die VVC stattgefunden, von einer funktionsuntüchtigen erworbenen Abwehr hin zu einem Fokus auf die angeborene Immunität. Beispielsweise konnten durch Candidakontakt induzierte spezifische Antikörper nicht mit einer Infektionsabwehr gegen Candida in Zusammenhang gebracht werden. Es wurde sogar in einer Vielzahl von Tierversuchen und klinischen Studien generell ein Schutzmangel an lokaler und systemischer erworbener Immunität festgestellt, was den Körper vermutlich immunregulatorisch vor einer über-

schießenden Immunreaktion und häufigen Entzündungen schützen soll. Nach dem heute gültigen Modell erfolgt die Infektionsabwehr ohne eine Entzündung, die Anfälligkeit hingegen steht in Verbindung mit einer über polymorphkernige Leukozyten (PMNL) vermittelten Entzündungsantwort und geht mit Vaginitis-Symptomen einher [22].

Ein weiteres Beispiel für die dominante Rolle des angeborenen Immunmechanismus sind die mukosalen Epithelzellen. Sowohl vaginale als auch orale Epithelzellen besitzen die Fähigkeit, Candidawachstum einzudämmen. Sie sind die ersten Zellen, die auf Schleimhäuten mit Candida in Kontakt treten. Damit kommt ihnen eine wichtige nicht-entzündliche Kontrollfunktion für das kommensale Candida-Wirts-Verhältnis zu [5,64].

1.1.2 Die orale und vaginale Candidiasis

1.1.2.1 Die orale Candidiasis

In der vorliegenden Arbeit betrachten wir immunologisch die zwei häufigsten Pilzinfektionen, die orale und vaginale Candidiasis, wobei die orale Form vor allem in jungen und sehr späten Lebensphasen die häufigste Pilzinfektion darstellt [1,32]. Mehr als 80% dieser oralen Infektionen werden durch die hefeartigen Pilze *C. albicans*, *C. glabrata* und *C. tropicalis* verursacht, während als weitere Spezies *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* und *C. pseudotropicalis* gefunden werden [6,65]. Über 95 % der oralen Candidosen werden von *Candida albicans* ausgelöst [25].

Die oropharyngeale Candidainfektion (OPC) führt zu lokalen Missempfindungen, einem gestörtem Geschmacksempfinden, Unterernährung, verlängertem Krankenhausaufenthalt, unter Immunsuppression zu einer systemischen Candidiasis und kann über eine Leukoplakie sogar zu einer Tumorentwicklung führen [29,39].

Eine Einteilung erfolgt in eine akute pseudomembranöse Form, eine akute atrophische Form, eine chronische hyperplastische Form, eine chronische atrophische Form, die mediane rhomboide Glossitis und die anguläre Cheilitis [48]. Die Entstehung einer OPC ist abhängig von der Adhäsion an Epithelwände über die Pilzwandkomponenten Mannose, des Weiteren von C3d Rezeptoren, Mannoprotein und Saccharine, dem Ausmaß der Hydrophobizität, der Bindungsfähigkeit an Fibronectin, der Keimfadenanordnung, der Anwesenheit von Mycelien, dem Verbleiben in Epithelzellen, Endotoxinen, der Induktion von TNF, Proteinasen und dem phenotypischen Switching [40,95]. Prädisponierende lokale Faktoren sind eine gestörte Speicheldrüsenfunktion, Medikamente wie inhalierbare Steroide, vorhandene Zahnprothesen, Leukoplakie, Mundhöhlenkarzinome und eine ausgeprägt kohlenhydratreiche Diät [20,66]. Die prädisponierenden systemischen Faktoren sind eine schädigende Lebensführung, Medikamente wie Breitspektrumantibiotika, Rauchen, Diabetes, Morbus Cushing und immunsupprimierte Zustände wie bei einer HIV Infektion, Leukämie und bei Unterernährung [33,63].

Die Behandlung der OPC erfolgt durch eine gute Mundhygiene, unter Verwendung chlorhexidinhaltiger Spüllösungen und einer darauf folgenden lokalen Antipilztherapie. Hierbei kommen hauptsächlich Nystatin, 1951 entdeckt, und Amphotericin B, seit 1956 bekannt, zur Anwendung. Beide Wirkstoffe werden lokal im Mund angewendet und wirken über eine Bindung an Pilzmembranstereotype, mit anschließender Änderung der Membranpermeabilität [7,34]. Für die lokale Therapie werden außerdem die Imidazole Mikonazol, Klotrimazol und Ketokonazol verwendet. Die systemische Antipilztherapie erfolgt mit den Triazolen Flukonazol, einem starkem Hemmstoff der Pilzenzyme, und Itrakonazol, welches ein größeres Aktivitätsspektrum als Flukonazol aufweist [37,75]. Zur Prophylaxe einer oralen Candidiasis eignen sich Flukonazol und Chlorhexidinspüllösungen. Abschließend lässt sich zur OPC sagen, dass sie unter angemessener und oben beschriebener Behandlung zu einer Ausheilung kommt [3,51].

1.1.2.2 Die vaginale Candidiasis

Als weitere häufige Formen einer Pilzinfektion untersuchen wir in der vorliegenden Arbeit die Immunreaktion auf eine vulvovaginale Candidiasis (VVC) und die rezidivierende vulvovaginale Candidiasis (RVVC). Die RVVC ist dabei durch das Auftreten von drei oder mehr Episoden einer VVC innerhalb eines Jahres definiert.

In 75-90 % der Fälle ist *Candida albicans* für eine VVC verantwortlich, gefolgt von *C. glabrata*, *C. tropicalis* und *C. parapsilosis* [76,94]. Im gebärfähigen Alter, am häufigsten aber zwischen 20 und 40 Jahren, erkranken etwa 75% aller Frauen an einer VVC, weitere 5-10% an einer RVVC, wobei manche Autoren das Vorkommen einer RVVC auch mit 40-55% angeben [14,94].

Zu den Symptomen zählen Brennen, Jucken, Schmerzen und abnormer Ausfluss. Sie werden heute auf eine aggressive angeborene Immunantwort durch PMNL-Infiltration zurückgeführt [22].

Anzeichen einer VVC sind Erytheme, Ödeme, Exkorationen und Fissuren, allerdings zeigen mehr als 20% gesunder Frauen mit positivem Candida-Nachweis keinerlei Symptome [36].

Die prädisponierenden Faktoren einer akuten VVC sind die Verwendung von Antibiotika und oralen hoch dosierten Östrogen-Kontrazeptiva, eine Hormonersatztherapie, Schwangerschaft und ein unbehandelter Diabetes mellitus [93]. Ebenso erhöht ein hoher Östrogenspiegel die Anfälligkeit für eine VVC [91]. Es sind allerdings keine prädisponierenden oder ätiologischen Faktoren für eine primäre RVVC bekannt. Ob Symptome entstehen oder nicht, entscheidet hier die lokale Immunantwort [94].

Bei einer sekundären RVVC, dem gehäuften Auftreten einer akuten VVC, wenn prädisponierende Faktoren nicht vermieden werden, spielen der Gebrauch von antibakteriellen Substanzen und systemischen Kortikosteroiden, immunsupprimierte Zustände wie Diabetes, Lupus, Schilddrüsenerkrankung und HIV eine

Rolle [94]. Einfluss haben aber auch das Sexualverhalten, Kleidungsgewohnheiten und spezielle Diäten.

Die Diagnose wird mittels Kulturanzüchtung auf Sabouraud-Dextrose-Agar und Lichtmikroskopie gestellt [91]. Im Falle einer Erkrankung wird lokal mittels Polyenen (Nystatin) und Imidazolen (Clotrimazol, Mikonazol), oral durch Imidazole (Ketokonazol) und Triazole (Flukonazol) und ergänzend lokal mit hydrokortikoidhaltiger Salbe behandelt.

Die RVVC ist deutlich schwieriger als die unkomplizierte VVC zu behandeln, hier werden wöchentliche Dosen oraler Flukonazole und Ketokonazole oder lokal 500 mg Clotrimazol für mindestens 6 Monate empfohlen [36,53].

In Tabelle 1 sind die Häufigkeit des Auftretens und die prädisponierenden Faktoren einer Candidiasis, zusammenfassend und getrennt in oral und vaginal, aufgeführt.

Tabelle 1 Epidemiologie und prädisponierende Faktoren der oralen und vaginalen *Candida albicans* Infektion [25]

	Oral	Vaginal
Hefepilzbesiedelung gesunder Individuen	40-70%	5-20%
In Prozent		
Candidiasis bei gesunden Frauen	selten	50-75%
<i>Candida albicans</i> Anteil an Candidosen	> 95%	75-90%
Prädisponierende Faktoren:		
- Antibiotikatherapie	selten	hoch
- Kontrazeptivatherapie	sehr selten	mittel
- Steroidtherapie	mittel	selten
- Chronische mukokutane Candidiasis	sehr häufig	selten
- Chemotherapie	häufig	selten
- AIDS	sehr häufig	selten
Recurrente Candidiasis (HIV negativ)	selten	5-10%
Resistenz gegen Fungizide	häufig	selten

Orale und vaginale Epithelzellen schütten während einer Candidiasis charakteristische Zytokine aus. Die Zytokine IL-4, IL-10 und IL-12 spielen in der zellulären Antwort der oralen und vaginalen Epithelzellen bei Candidiasis eine zentrale Rolle.

1.1.3 Interleukin-4 (IL-4) und Candidiasis

IL-4, B-cell stimulating factor 1 (BSF-1) genannt, wird am Genort 5q31 codiert und hat eine globuläre Struktur mit hydrophobem Kern (s. Abb. 2). Es wird aus 129 Aminosäuren gebildet und wiegt 15 kDa. Sein Rezeptor besteht aus zwei Ketten, einer alpha-Kette = p140 und einer gamma-Kette = p64. Die Produktion findet in Mastzellen, Th-2 Zellen, Basophilen, Eosinophilen und Knochenmark-Stromazellen statt. In Eosinophilen ist IL-4 in Granula enthalten, aus denen es durch einen Eotaxinreiz schnell entladen wird. Als Zielorte gelten T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten [41,70]. Die Hauptwirkung dieses Zytokins beruht in der Förderung der Differenzierung und Proliferation von B-Zellen in IgG4- und IgE- produzierende Plasmazellen. Damit begünstigt es die Synthese von Antikörpern und spielt durch die IgE-Produktion eine Rolle bei der Entstehung von allergischen Erkrankungen und Asthma [41,70]. Seine Wirkung auf B-Zellen wird durch IFN-gamma inhibiert. Positiv verstärkend wirkt IL-4 auf Th2-Zellen ein, indem es deren Entstehung aus Th0-Zellen begünstigt und somit seine eigene Sekretion induziert [52,70]. Auch in dendritischen Zellen kann es seine eigene Bildung unterstützen. Ebenso wichtig ist es für die Bildung von Typ-1 dendritischen Zellen, wobei es die Differenzierung von Typ-2 dendritischen Zellen aus Vorläuferzellen hemmt. Während der Bildung dendritischer Zellen führt IL-4 zu einem Anstieg der IL-12 Produktion. Durch die Förderung IL-12-induzierter Proliferationen kann dieses Zytokin aber auch direkt Th1-Zellfunktionen verstärken [44,54,70].

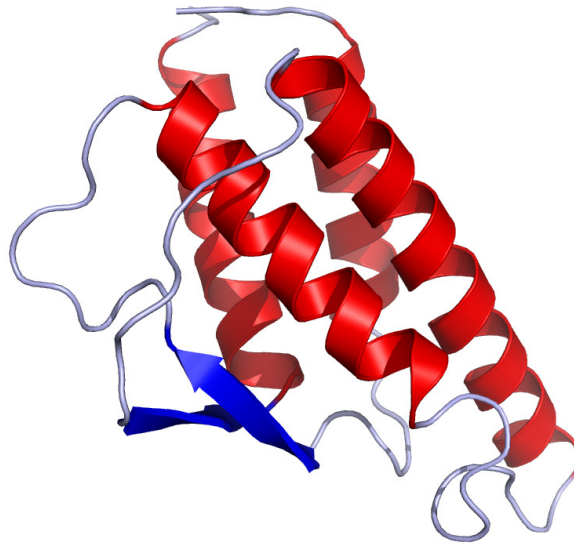


Abbildung 2: Interleukin 4 [101]

Zusätzlich dazu übernimmt IL-4 eine Reihe unterdrückender Funktionen. Über eine Downregulierung von IFN-gamma durch Th1-Zellen führt IL-4 zu einer Hemmung der zellulären Immunantwort (CMI). Ebenso hemmt es die durch IL-2 induzierte Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK) und antagonisiert die von IL-2 in B-Zellen ausgelösten Effekte. Des Weiteren wird durch IL-4 die Produktion von IL-1, TNF-alpha und IL-8 in Makrophagen eingeschränkt. Indem IL-4 die IL-10 Bildung hemmt, wird andererseits die IL-12 Bildung in mononuklearen Zellen angeregt [12].

In Bezug zu einer Candidainfektion zeigten sich für IL-4 folgende Ergebnisse: Tierversuche legten einen starken Zusammenhang zwischen einer IL-4-Produktion und der Th2-Antwort und damit einer erhöhten Infektionsanfälligkeit dar [59]. Wird in frühen Infektionsphasen IL-4 zugegeben, führt dies zu einer Intensivierung der Candidiasis [100]. Eine Neutralisation des Zytokins in dieser Phase bewirkt die Entwicklung einer Th1-Antwort und eine Heilungsrate von mehr als 90%. Im Gegensatz dazu wurde in späten Infektionsphasen durch eine Neutralisation von endogenem IL-4 eine Ausweitung der Infektion beobachtet [59] und Mäuse ohne IL-4 Produktion erlitten eine systemische Candidiasis. Eine Zugabe von exogenem IL-4 und eine verstärkte IL-4 Produktion erhöhte in dieser Phase die Widerstandsfähigkeit der Versuchstiere deutlich [56].

1.1.4 Interleukin-10 (IL-10) und Candidiasis

IL-10, auch Cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF) genannt, wird am Genort 1 codiert. Es besteht aus 160 Aminosäuren und besitzt die Struktur eines links-gewundenen antiparallelen Vier-Helix-Bündels mit einem Gewicht von 35-40 kDa (s. Abb. 3). Der IL-10 Rezeptor ist einkettig und zeigt eine Homologie zu dem IFN-gamma und IFN-alpha/ beta Rezeptor. Seine Entstehungsorte sind Th-0 und Th-2 Zellen, aktivierte CD4+ und CD8+ T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, in denen die Produktion dieses Interleukins durch eine Vielzahl von Bakterien, Viren und Parasiten angeregt wird. Ziel-

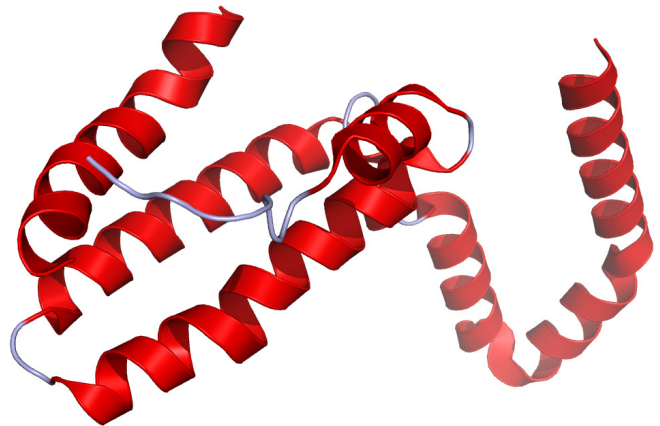


Abbildung 3: Interleukin 10 [106]

orte sind B-Zellen, Thymozyten, Th-1 Zellen, Monozyten und natürliche Killer-Zellen (NK), wobei die Hauptaufgabe in der Aktivierung und Proliferation von B-Zellen, Thymozyten und Mastzellen besteht [52,69,70].

IL-10 hemmt die Entzündungsantwort und die angeborene und erworbene Immunabwehr und ebnet so den Weg für die Ausbreitung von Mikroben und chronischen Infektionskrankheiten. Es spielt eine Hauptrolle in der Entwicklung einer Th2-Antwort auf *C. albicans* und der Unterdrückung der Th1-Zell-Immunität [84,86].

Dies geschieht vor allem über Sekretionshemmung von IL-12 aus dendritischen Zellen und damit über die Behinderung einer IFN-gamma Ausschüttung. So wird auch die IFN-gamma stimulierte Synthese von NO beeinträchtigt [84]. IL-10 beeinflusst die T-Zellen über die Downregulierung der Zytokin-Produktion durch Makrophagen und dendritischen Zellen und führt zu einer ausgeprägten

Immunsuppression. Auch die Pilzabwehrmechanismen der Monozyten gegen *C. albicans* werden gehemmt [78].

Viele Erkenntnisse über das Zusammenspiel von IL-10 und einer Candidiasis wurden aus Tierversuchen gewonnen.

Es zeigte sich, dass Mäuse, die kein IL-10 produzieren konnten, widerstandsfähiger gegenüber einer Candidainfektion waren, da sie eine ausgeprägtere Th1-Antwort entwickelten [13]. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass physiologische Konzentrationen von IL-10 wichtig für eine optimale *C. albicans* Abwehr sind. Sie werden in Zusammenhang mit einem Schutz vor einer überschießenden Th-1-Zytokin-Produktion durch Entzündungszellen gebraucht [55]. Auf diesem Weg verhindert IL-10 immunpathologische Schäden, die durch eine überschießende Immunreaktion auf Infektionen entstehen würden.

1.1.5 Interleukin-12 (IL-12) und Candidiasis

IL-12, natural killer cell stimulatory factor (NKSF) und cytotoxic lymphocyte maturation factor (CLMF) genannt, besitzt eine heterodimere Struktur aus zwei Ketten (p35 und p40) mit jeweils 196 bzw. 306 Aminosäuren und ein Gewicht von 30-33 und 35-44 kDa (s. Abb. 4). IL-12 ist das erste entdeckte heterodimere Zytokin. Die Gene für die IL-12 Untereinheiten befinden sich auf den Chromosomen 3p12-3q13.2 und 5q31-33 [92]. Sein großer Rezeptor ähnelt strukturell dem G-CSF Rezeptor. Makrophagen und dendritische Zellen sind die Hauptquelle dieses Interleukins, es wird aber auch von Monozyten, Phagozyten und B-Zellen gebildet [70,108]. Zielzellen sind die T-Zellen und die natürlichen Killerzellen [43].

Die Hauptaufgabe von IL-12 liegt in der Aktivierung und Differenzierung von Th-1 Zellen. Dendritische Zellen schütten IL-12 nach Interaktion mit CD40-Liganden aus und fördern so die Differenzierung von CD4+-Zellen in Th-1 Zellen. Diese sezernieren daraufhin IL-2 und IFN-gamma und führen so zu einer inflammatorischen T-Zellantwort. Auch natürliche Killerzellen (NK) und zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) werden von IL-12 stimuliert [52,70]. Eine niedrige IL-12 Konzentration aber erleichtert die Differenzierung von Th2-Zellen und somit die Sekretion der Zytokine IL-4 und IL-10. Aus Tierversuchen ergaben sich folgende Er-

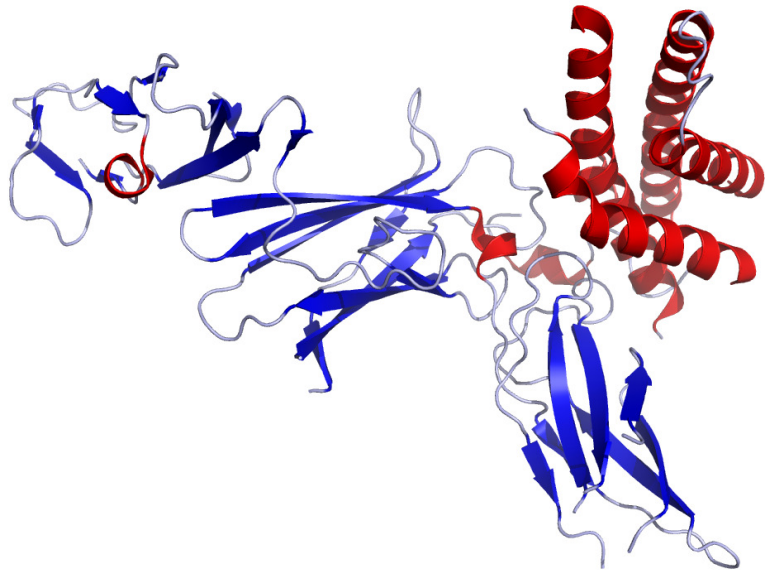


Abbildung 4: Interleukin 12 [105]

kenntnisse über das Zusammenspiel von IL-12 und einer Candidainfektion. Mäuse ohne IL-12 Produktion waren unfähig, eine schützende Th1-Immunität aufzubauen. Sie produzierten vermehrt IL-4 durch CD4+ Zellen und sezernierten weniger IL-10. Wurde nun exogenes IL-10 und IL-12 substituiert, sank die IL-4 Produktion und die Widerstandsfähigkeit gegen eine Infektion wurde erhöht [56]. Die IL-12 Produktion war in Mäusen mit einer schützenden Immunantwort verbunden, durch IL-10 hingegen weitete sich die Candidiasis aus. In Mäusen mit Candidiasis wiederum induzierte IL-12 die IL-10 Bildung [80]. Seine eigene Produktion wurde durch IFN-gamma gefördert.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Immunabwehr gegen eine Candidiasis ein komplexes Zusammenspiel von mehreren, sich gegenseitig kontrollierenden und bedingenden Interleukinen darstellt.

1.2 Fragestellung

Die Besiedelung von Vagina und Mundraum mit *Candida* spp. aktiviert die zellvermittelte Immunreaktion, wobei eine Vielzahl von Zytokinen an dieser speziellen Immunabwehr beteiligt ist. Bisher sind allerdings noch keine Studien durchgeführt worden, die eine immunologische Reaktion auf Pilzbefall im Mundraum und Vagina durch Messung von Interleukin-Konzentrationen vergleichen.

Daher wurde in der vorliegenden experimentellen Studie die immunologische Reaktion von Vaginal Lavage und Speichel in Abhängigkeit vom Candidastatus in einem ausgewählten Patientinnenkollektiv beschrieben.

Um die Fragestellung zu beantworten, untersuchten wir im Rahmen der mikrobiologischen Spezialsprechstunde des Klinikums Großhadern der LMU München 33 Patientinnen mit oralem und simultanem vaginalen Pilzbefall, 8 Patientinnen mit oralem Pilzbefall, 25 Patientinnen mit vaginalem Pilzbefall und eine asymptotische Kontrollgruppe bestehend aus 76 Candidanegativen Patientinnen. Die Proben wurden von uns mittels kultureller Anzucht in Sabouraud-Agar Flüssigkulturröhrchen, Lichtmikroskopie, Ausstrich auf Chrom-Agar Platten und PCR auf möglichen Pilzbefall untersucht. Schließlich bestimmten wir in allen Proben die Konzentrationen der Zytokine IL-4, IL-10 und IL-12 mit Hilfe des ELISA-Test. Dabei stellten wir uns die Frage, ob sich in einem Vergleich der Zytokin-Konzentrationen von IL-4, IL-10 und IL-12 Unterschiede in der Immunreaktion von Vagina und Mundraum auf eine Candidainfektion finden lassen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Flüssigkulturröhrchen, Sabouraud milieu
liquide (SAB B – T)

Fa. bioMerieux,
Marcy l'Etoile,
Frankreich

Chromagarplatten, BBL Chromagar
Candida

Fa. Becton
Dickinson Sparks,

2.2 Patientinnengut

2.2.1 Patientinnen

Die Studiengruppe umfasst 142 Patientinnen, die in der mikrobiologischen Sprechstunde des Klinikums Großhadern untersucht wurden. Dieses Kollektiv wurde nach vorhandenem Pilzbefall in Mundraum und Vagina in folgende vier Untergruppen unterteilt.

Tabelle 2 Einteilung des Patientinnenkollektivs

<u>Pilzkultur</u>	<u>Anzahl n</u>	<u>Gruppe</u>
Positiv in Vaginal- und Mundprobe	33	1
Positiv in der Mundprobe	8	2
Positiv in der Vaginalprobe	25	3
Keine positive Pilzkultur	76	4

Die größte Untergruppe stellt mit $N = 76$ Patientinnen und einem Durchschnittsalter von 42 (Alter 18 bis 78) Gruppe 4, die Kontrollgruppe, dar. Gruppe 1 folgt mit $N = 33$, wobei das Durchschnittsalter 39 (Alter 21 bis 79) beträgt. In Gruppe 3, mit $N = 25$, liegt das Durchschnittsalter bei 40 (Alter 20 bis 60), während Gruppe 2, mit $N = 8$, und dem Durchschnittsalter von 40 (Alter 24 bis 70) die kleinste Untergruppe darstellt. Die Patientinnen des Studienkollektivs waren zwischen 18 und 79 Jahren alt und die Mediane der Gruppen deuten auf ein vergleichbares Alter hin.

Mit Hilfe eines Fragebogens wurden die Patientinnen auf die folgenden neun Parameter untersucht:

1. Schwangerschaft

Eine Schwangerschaft gilt als einer der prädisponierenden Faktoren für eine akute VVC [64]. Auch wurde das Auftreten einer oralen Candidiasis bei Schwangeren signifikant erhöht gegenüber einer Kontrollgruppe festgestellt [87]. Wir stellten uns die Frage, ob sich durch eine Schwangerschaft signifikante Gruppenunterschiede bezüglich einer Candidainfektion im Patientinnenkollektiv finden lassen.

2. Leukozyten in der Vaginalprobe

Eine große Zahl an Leukozyten im mikroskopischen Nachweis ist ein Hinweis auf eine entzündliche Infektion [42]. Wir stellten uns die Frage, ob sich bezüglich dem Leukozytennachweis und einer Candidainfektion Gruppenunterschiede finden lassen.

3. Parodontaltherapie

Unter einer Parodontaltherapie versteht man die systematische Behandlung der Erkrankungen des Zahnhalteapparates und der Gingiva mittels mechanischer Reinigung der Zahnfleischtaschen mit Hand- und Ultraschallinstrumenten, chirurgischer Therapie und adjuvanter Pharmakotherapie. Da sich dabei auch die mikrobielle Flora des Parodonts ändert, fragten wir uns, ob sich ein

signifikanter Einfluss auf die Gruppenzugehörigkeit und eine Candidainfektion feststellen lässt.

4. Professionelle Zahnreinigung

Die professionelle Zahnreinigung beinhaltet die supra- und subgingivale Reinigung der Zahnflächen mit Hand-, Ultraschall- und Sandstrahlinstrumenten und ihre Politur. Wir stellten die Frage, ob diese Verbesserung der Mundhygiene die Gruppenzugehörigkeit bezüglich einer Candidainfektion beeinflusst.

5. Gastrointestinale Beschwerden

In einer Stellungnahme des Robert-Koch-Instituts kommen Experten zu dem Schluss, dass eine durch eine Candidainfektion ausgelöste allergische Sensibilisierung des Magen-Darm-Traktes nicht ausgeschlossen werden kann [19]. Wir stellten die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen Magen-Darm-Beschwerden, einer Candidainfektion und der Gruppenzugehörigkeit gibt.

6. Pilzerkrankungen

Wir stellten die Frage, ob das Vorhandensein einer Pilzerkrankung in der Anamnese einen Einfluss auf die Gruppenzugehörigkeit bezüglich eines Pilzkulturnachweises hat.

7. Mundtrockenheit

Hermann P. et al. fanden in ihrer Studie mit Stammzell-Transplantationspatienten heraus [38], dass Patienten mit Hyposalivation eine höhere Inzidenz an Candida albicans-Infektionen aufwiesen, als solche mit regulärem Speichelfluss. Wir fragten uns, ob sich in unserem Patientinnengut, aufgrund des Symptoms Mundtrockenheit, eine spezielle Gruppenzugehörigkeit bezüglich einer Candidainfektion finden lässt.

8. Mundgeruch

Mundgeruch wird hauptsächlich auf einen Bakterienstoffwechsel und daraus resultierende flüchtige Schwefelverbindungen zurückgeführt [73]. Wir stellten

uns die Frage, ob sich mittels des Symptoms Mundgeruch ein signifikanter Unterschied in der Gruppenzugehörigkeit darlegen lässt.

9. Symptome: Brennen, Jucken, Fluor vaginalis und Rötung

Diese Symptome können alle im Zusammenhang mit einer VVC beobachtet werden, allerdings weisen über 20% der gesunden Frauen mit positivem *Candida* spp. Befund keine dieser Symptome auf [14,25]. Daher fragten wir uns, inwiefern sich anhand dieser Symptome Gruppenunterschiede bezüglich einer Candidainfektion finden lassen.

2.2.2 Pilz - Kultur - Nachweis

Alle für die Abstriche verwendeten Geräte sind im Anhang in Kapitel 7.1. aufgeführt.

Im Rahmen der Sprechstunde wurden jeder Patientin 2 ml 0.9 %-ige physiologische Kochsalzlösung (NaCl) mit einer 3 ml Spritze in die Vagina eingebracht. Mittels eines Watteträgers wurde die Lösung mit dem Vaginalsekret des hinteren Scheidengewölbes durchmischt und mit derselben Spritze wieder aufgenommen. Um die Mundproben zu erhalten, wurden die Patientinnen aufgefordert, 2 ml 0.9 %-ige physiologische NaCl – Lösung mit dem Mund aus der 3 ml Spritze aufzunehmen. Diese wurde im Folgenden gründlich mit Speichel vermengt und anschließend in einen Plastikbecher abgegeben, um diese dort mit derselben Spritze wieder aufzunehmen. Im Labor der Klinik wurden die Spritzen geschüttelt und jeweils zwei Tropfen in ein Sabouraud-Agar Flüssigkulturröhrchen abgegeben. Diese wurden ebenfalls geschüttelt und für 3 – 5 Tage im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Die Spritzen wurden bis zur weiteren Verarbeitung in einem Kühlschrank bei – 20° C eingelagert. Anschließend wurde der Sabouraud – Flüssig – Agar unter dem Mikroskop auf *Candida*-Sprosszellen untersucht (s. Abb. 4).

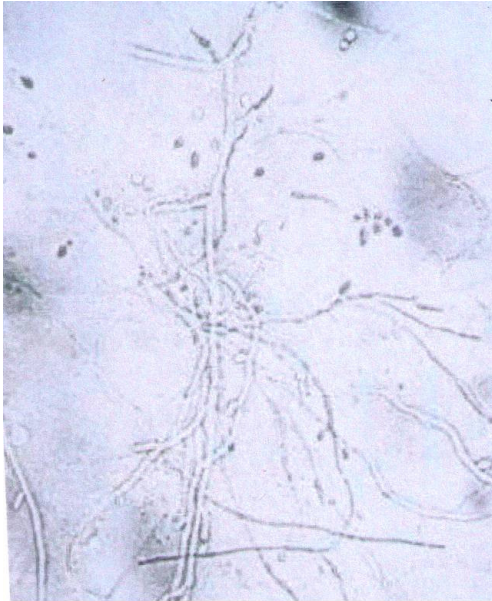


Abbildung 4: *Candida albicans* [8]

Nach mehrtägiger Bebrütung der Agar-Flüssigkulturröhrchen wurde optisch und mittels Geruch das Ergebnis bewertet. Wenn sich im Gefäß eine deutliche Trübung und ein hefeartiger Geruch beim Öffnen desselben zeigte, wurde ein positiver Pilzbefund angenommen. Daraufhin konnte eine Speziesdifferenzierung auf einer Chrom-Agar-Platte erfolgen. Für diese Differenzierung wurden Kulturen aus den Sabouraud-Röhrchen mit einer sterilen Öse auf einer Chrom-Agar-Platte ausgestrichen (siehe Abb. 5), mit einem Klebeband luftdicht verschlossen und weitere zwei bis drei Tage bei 37°C inkubiert. Anhand der unterschiedlichen Farbreaktion der *Candida* spezie mit den Inhaltsstoffen des Nährbodens ist folgende Unterscheidung zulässig:



Abbildung 5: *Candida albicans* Kultur [9]

Färbung nach

Grün

Rosa

Blau

Hellrosa

Pilznachweis

Candida albicans

Candida glabrata

Candida tropicalis

Candida krusei

2.3 DNA – Extraktion

2.3.1 Material

Aqua ad iniectabilia

PBS, Dulbecco's Gibco Brl

Zusammensetzung Lytikaselösung :

Lytikase, 4.2. mg, Sigma L – 2524

10000 Units Lot 033K8604

PBS, 6.7 ml

0.5 M EDTA, 1.7 ml

Fa. Delta Select

Fa. Life Technologies,
Paisley Scotland

Fa. Sigma, St. Louis,
Missouri USA

Fa. Sigma, St. Louis,
Missouri USA

2 % Mercaptoethanol, 168 µl

Fa. Sigma, St. Louis,
Missouri USA

Aliquots, 1 ml, -20° C

Lysis Puffer, Reporter Gene Assay Lysis
Buffer 1 897675, 5 x conc.

Fa. Roche Diagnostics,
Branchburg, New Jersey,
USA

Zusammensetzung Nonionic Detergent Puffer (NID Puffer) :

KCL, 50 mM

Fa. Sigma, St. Louis
Missouri, USA

Tris – HCL, pH 8.3., 10 mM

Fa. Sigma, St. Louis,
Missouri, USA

MgCl₂, 2.5 mM

Fa. Sigma, St. Louis,
Missouri, USA

Polyoxyethylenlaurylether

Fa. Carl Roth GmbH + Co,
Karlsruhe, Deutschland

Proteinase K, PCR Grade, 50 mg/ml

Fa. Roche Diagnostics,
Branchburg, New Jersey,
USA

2.3.2 Durchführung der DNA-Extraktion

Die Geräte, die für die Zellaufschlüsse benötigt wurden, sind in Kapitel 7.1. des Anhangs aufgeführt.

In einem ersten Schritt wurden die Proben für den Zellaufschluss der Candida Polymerase chain reaction (PCR) vorbereitet. Dazu wurden die Spritzen der Vaginal- und Mundproben aufgetaut, gevortext und anschließend zu gleichen Teilen auf zwei Eppendorfgefäße verteilt. Diese wurden bei 13000 U/m 3 – 5

min. zentrifugiert und im Anschluss der Überstand für die Interleukinbestimmung mittels Pipette entnommen, wobei immer ein Pellet am Boden des Gefäßes belassen wurde. Ebendieses Pellet wurde mit 500 µl PBS – Lösung überschichtet und zur weiteren Verarbeitung eingefroren. In einem zweiten Schritt erfolgte der eigentliche Zellaufschluss. Hierzu wurden die Proben erneut aufgetaut, das Pellet mittels einer Pipette resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette entnommen. Das verbliebene Pellet wurde mit 500 µl sterilem Wasser vollständig in Lösung gebracht und gewaschen, anschließend 2 – 3 min. bei 11000 U/m zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand erneut abpipettiert, das Pellet in 100 µl Lyticase – Lösung resuspendiert und für eine Stunde in einem Wasserbad bei 37° C inkubiert. Nach der Inkubation wurde den Proben 500 µl PBS zugegeben, diese zentrifugiert und abermals der Überstand mittels Pipette entnommen. Das so erhaltene Pellet wurde in 200 µl Lysis-puffer aufgelöst und 10 min. bei Raumtemperatur einer Inkubation unterzogen. Im Folgenden wurden erneut 500µl PBS zupipettiert und 5 min. lang bei 11000 U/m zentrifugiert. Auch dieser Überstand wurde mittels Pipette entfernt und das Pellet mit 240 µl Nonionic Detergent Puffer (NID Puffer) und 10 µl Proteinase K resuspendiert. Daraufhin wurden die Proben bei 56° C im Mastercycler für eine Stunde inkubiert und im Anschluss die Proteinkinase K durch 10 min. bei einer Temperatur von 95° C inaktiviert. Diese Proben wurden im Kühlschrank bei – 20° C eingefroren.

2.4 DNA – Extraktion mit dem Purgene DNA Purification Kit

2.4.1 Material

Purgene DNA Purification Kit	Fa. Gentra Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Cell Suspension Solution	alle ebendort
Lytic Enzyme Solution	
Cell Lysis Solution	
Protein Precipitation Solution	

2.4.2 Durchführung der DNA-Extraktion mit dem Purgene DNA Purification Kit

Da die Polymerasekettenreaktion (PCR) für die Vaginal- und Mundproben im Vergleich zum Pilzkulturnachweis ein paradoxes Ergebnis lieferte (Kultur positiv, aber PCR negativ), entschlossen wir uns zu einer erneuten DNA – Extraktion mit dem Purgene DNA Purification Kit der Firma Gentra Systems. Dieses Verfahren lässt sich in die Schritte Zellsplaltung, Proteinausfällung, DNA- Ausfällung und DNA-Hydratation unterteilen. Für die Zellsplaltung wurden die aufgetauten Proben kurz gevortext, mit 13000 U/m zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das verbliebene Pellet wurde mittels einer Pipette und 500 µl destilliertem Wasser durch Einsaugen und Wiederabgabe gewaschen, ebenfalls zentrifugiert und vom Überstand befreit. Dieses Pellet wurde durch auf- und abpipettieren in 300 µl Zell – Suspensions – Lösung (Cell Suspension Solution) gewaschen und nach Zugabe von 1,5 µl Aufspaltungs – Enzym – Lösung (Lytic Enzyme Solution) in einem geschlossenen Ep-

pendorfgefäß 25 mal gründlich durchgeschüttelt. Anschließend erfolgte eine 30 minütige Inkubation im 37°C temperierten Wasserbad, in der die Gefäße mehrmals geschüttelt wurden. Daraufhin wurden die Proben erneut zentrifugiert, die Überstände abpipettiert und das Pellet mit 300 µl Zell – Aufspaltungs – Lösung (Cell Lysis Solution) durchmischt. Für den Schritt der Proteinausfällung wurden den so vorbereiteten Proben 100 µl Protein – Ausfällungs – Lösung (Protein Precipitation Solution) zugegeben und anschließend 20 Sekunden gevortext. Immer wenn sich nach dem anschließenden Zentrifugieren kein Pellet am Boden des Gefäßes zeigte, wurde die Probe abermals gevortext und 5 min. auf Eis inkubiert, woraufhin nochmals zentrifugiert wurde. Der Schritt der DNA- Ausfällung wurde mit dem Überführen des Überstandes in ein Eppendorfgefäß eingeleitet, welches 300 µl 100 %- iges Isopropanol enthielt. Nach dem 50 - maligen Durchschütteln des Gefäßes sollte die DNA in Form weißer Schlieren bereits mit bloßem Auge erkennbar sein. Durch anschließendes Zentrifugieren zeigte sich die DNA als kleines weißliches Pellet am Boden des Gefäßes. Nun wurde erneut der Überstand entfernt und das Pellet durch Zugabe von 300 µl 70%-igem Ethanol und darauffolgendem Schütteln gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren und Abpipettieren des Ethanols wurden die Eppendorfgefäße zum Trocknen für 15 min. auf ein saugfähiges Fließ gestellt. Im letzten Schritt wurde nun 50 µl DNA-Hydrationslösung (DNA Hydration Solution) dem Pellet hinzugefügt und mit 1,5 µl RNase A Lösung (RNase A Solution) für 1 Sekunde gevortext. Darauf folgte ein kurzes Zentrifugieren und ein 15 minütiges Inkubieren bei 37° C im Wasserbad bildete den Abschluss der DNA-Freisetzung.

2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.5.1 Material

Zusammensetzung DNA – Polymerisationsmix :

MgCl ₂ , 25 mM	Fa. Promega Corporation, USA
Desoxynukleosidtrisphosphate (dNTP), (dATP, aTTP, dGTP und dCTP), 10 mM	Fa. Promega Corporation, USA

Zusammensetzung 10X PCR – Puffer, pH 8, 3	Fa. Perkin Elmer, Branchburg, New Jersey, USA
--	---

KCL, 500 mM

Tris – HCL, 100 mM

MgCl₂, 15 mM

Gelatine, 0,01%, w/v

Taq – Polymerase, 5 U/μl	Fa. Perkin Elmer, Branchburg, New Jersey, USA
--------------------------	---

5X Gree Go Taq Flexi Buffer	Fa. Promega Corporation, USA
-----------------------------	------------------------------

2.5.2 Durchführung der Polymerasekettenreaktion

Alle für die PCR verwendeten Geräte sind ebenfalls im Anhang unter 7.1. aufgeführt.

Das Verfahren der Polymerasekettenreaktion dient dem Nachweis kleinstmöglicher Mengen an Pilz spezifischer DNA, d.h. die PCR eignet sich schon zum Nachweis eines Candida spezifischen DNA – Moleküls und ist somit erheblich sensativer als der Pilzkulturnachweis mittels Chromagarplatten. Um in

der elektrophoretischen Auswertung der PCR einen direkten Vergleich der Proben zu ermöglichen, haben wir jedem PCR – Durchlauf zwei positive und eine negative Kontrollprobe gegenübergestellt. Für die positiven Kontrollen haben wir *Candida albicans* und *Candida glabrata* Pilzkulturmateriale gewonnen und dem Zellaufschluß unterzogen, die negative Kontrolle bestand aus sterilem Wasser. Die zwei Oligonucleotide, komplementär zu jeweils einem Strang der Pilz - DNA, waren die Primer ITS3 5` und ITS4 3` der Firma Life Technologies. Sie lagern sich an die einzelnen DNA – Stränge an und bilden kurze Doppelstrangelemente, die als die eigentlichen Initiatoren der Kettenreaktion fungieren. Ihre Sequenzen bestanden aus :

Primer 1 ITS3 5` GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC

Primer 2 ITS4 3` TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC

Zur Durchführung der PCR verwendeten wir einen einheitlichen Mastermix der Reagenzien, um deren Verhältnis in jedem Probengefäß konstant zu halten. Er bestand aus:

Reagenz	Volumen
destilliertem H ₂ O	34,5 µl
dNTP, 10 mM	1,0 µl
Puffer, 10 – fach konz.	5,0 µl
MgCl ₂ , 25 mM	3,0 µl
Primer ITS 3	2,5 µl
Primer ITS 4	2,5 µl
Taq – Polymerase	0,5 µl

Zusammengenommen ergibt sich aus diesen Reagenzien ein Gesamtvolumen von 49 µl. Dieses wurde pro Gefäß mit 1 µl DNA – Probe zu einem Volumen von 50 µl ergänzt. In unserem Fall durchliefen 33 DNA – Proben in einem Schritt die PCR-Zyklen. Somit mussten zum Erhalt des Mastermixes die Ein-

zelvolumina der Reagenzien mit dem Faktor 38 (33 Proben + 2 positive Kontrollen + 1 negative Kontrolle + 2 kalkulierte Überstände) multipliziert werden, um eine ausreichende Menge sicherzustellen. Die PCR – Gefäße wurden nach vorigem Schema mit 50 µl Reaktionsansatz befüllt, kurz gevortext und zentrifugiert und durchliefen dann im Mastercycler in der Candida Einstellung (Files) die Reaktionszyklen. Danach wurden die Gefäße im Eisschrank bei – 20° C eingefroren. Da im Pilzkulturausstrich einige Mund – und Vaginalproben ein positives Ergebnis lieferten, in der PCR aber negativ erschienen (s. Anhang 7.2.), entschlossen wir uns für eine erneute DNA-Extraktion mittels Purgene DNA Purification Kit der Firma Gentra Systems (s. 2.4.). Dieses Vorgehen zeigte für die Mundproben kein differentes Ergebnis, wohl aber für die Vaginalproben. Deshalb erhöhten wir für die Mundproben den DNA – Anteil auf 5 µl pro Reaktionsansatz.

Allerdings da das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes weiterhin 50 µl betragen sollte, mussten die Einzelkonzentrationen der Reagenzien auf ein Volumen von $50\ \mu\text{l} - 5\ \mu\text{l} = 45\ \mu\text{l}$ umgerechnet werden. Auch dieser Schritt führte zu keinem neuem Ergebnis wie im herkömmlichen Vorgehen. Daher sahen wir von einem weiteren Purgene – Zellaufschluss der Mundproben ab und verwendeten für diese das Ergebnis des ersten Zellaufschlusses (s. 2.3.).

2.6 Gelelektrophorese

2.6.1 Material

Zusammensetzung des Rotiphorese 10 X TBE Puffer :

Tris – Borat, pH 8.3, 1 mM

Fa. Carl Roth GmbH,

Karlsruhe, Deutschland

EDTA, 20 mM

Fa. Carl Roth GmbH,

Karlsruhe, Deutschland

Deionisiertes Wasser

Agarose, for routine use	Fa. Sigma – Aldrich Chemie, GmbH, Deutschland
Ethidiumbromid 1 %	Fa. Genaxxon Bio Science, GmbH, Deutschland
DNA Blue Run	Fa. Hybaid
DNA Ladder, 100 bp	Fa. New England Bio Labs

2.6.2 Durchführung der Gelelektrophorese

Durch die Gelelektrophorese ist es möglich, die Größe der Proben-DNA-Stränge mit der bekannten Größe der Standardproben (*C. albicans*, *C. glabrata*, destill. H₂O) zu vergleichen. Die PCR-Ergebnisse können optisch unter UV-Licht somit als positiv oder negativ bewertet werden.

Wir begannen mit der Herstellung eines 1,5 % - igen Agarosegels, indem wir 100 ml 10 X Rotiphorese-TBE-Puffer mit 900 ml H₂O verdünnten und darin mittels eines Elektrorührers mit Rührfisch 375 mg Agarose lösten.

Danach wogen wir das Gefäß mit dem Gel, erhitzen es in der Mikrowelle bis zur Blasenbildung des Gels und der vollständigen Lösung der Agarose, wogen das Gefäß erneut und ergänzten verdunstetes Wasser mit erhitztem, destillierten H₂O. In die klare Lösung gaben wir 2 µl 1 % - iges Ethidiumbromid, vermengten es gründlich, gossen die gesamte Flüssigkeitsmenge in die Elektrophoresekammer und setzten zwei Kämme im Abstand von einer halben Kammerbreite ein. Das Gel härtete innerhalb von zehn Minuten aus. Danach wurde es in das eigentliche Elektrophoresegerät gestellt und soweit mit 10 – fach verdünntem TBE – Puffer überschichtet, bis es vollständig überdeckt war. Das Entfernen der beiden Kammschablonen hinterließ 24 Vertiefungen, die über folgendes Schema Inhalt zupipettiert bekamen:

Anzahl	Inhalt	Menge
19	Proben	10 µl
3	Kontrollen	10 µl
2	Marker	6 µl

Der Marker, der jeweils am Kammanfang in das Reservoir abgegeben wurde, bestand aus 5 µl DNA Ladder und 1 µl Blue Run Farbstoff. Die Kontrollen (*C. albicans*, *C. glabrata*, destilliertes H₂O) wurden für eine bessere Übersicht in die sich anschließenden Vertiefungen eingebracht. An die solchermaßen beschickte Gelplatte wurde eine Spannung von 300 V mit einer Stromstärke von 120 mA angelegt und nach visueller Kontrolle für ca. 15 –20 min. stehen gelassen. Nach dem Ausschalten der Spannungsquelle wurde die Gelplatte vorsichtig auf die UV – Lampe geschoben und durch eine Schutzbrille und ein Schutzschild beurteilt. Zu Dokumentationszwecken wurde ein Polaroid-Fotoapparat über das Gel und das UV – Licht gestellt und mit Blende Elf und einer Belichtungszeit von einer Minute ein Polaroid erstellt:

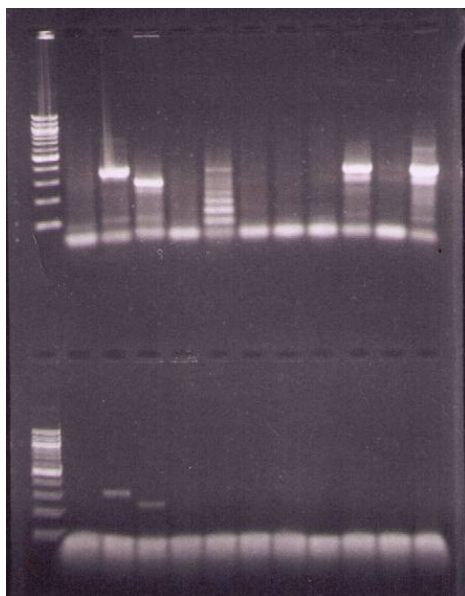


Abbildung 6: Polaroidbild einer Gelplatte
(eigene Untersuchung)

2.7 Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)

Interleukine sind Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 15 bis 25 kDa. und lassen sich somit in Mikrotiterplatten aus Polystyrol über eine Antigen – Antikörperreaktion nachweisen. Der eigentliche quantitative Nachweis der Interleukine 4, 10 und 12 erfolgte über die fotometrische Messung der abschließenden Farbreaktion.

2.7.1 Material

Alle für die Bestimmung der Interleukine 4, 10 und 12 verwendeten Reagenzien entnahmen wir dem ELISA – Kit der Firma Biosource, Camarillo, CA, USA. Folgende Reagenzien kamen zur Anwendung :

Human Interleukin Standard

Standard Diluent Buffer

Human Interleukin Biotin Conjugate

Streptavidin – HRP Diluent

Human Interleukin Streptavidin HRP, 100 X

Wash Buffer concentrate, 25 X

Stabilized Chromogen

Stop Solution

Die genaue Vorgehensweise der Interleukinbestimmung wird im Anschluss für die einzelnen Interleukine getrennt aufgeführt.

2.7.2 Interleukin – 4 Nachweis

Wir begannen den IL – 4 - ELISA mit dem sorgfältigen Vortexen aller im Kit enthaltenen Reagenzien. Dann mischten wir den Human IL – 4 - Standard mit 1.140 ml Standardverdünnungspuffer, um eine Konzentration von 10.000 pg/ml

zu erhalten. Im Anschluss erstellten wir eine Standardverdünnungsreihe in acht Eppendorfgefäßen, indem wir 0,950 ml Standardverdünnungspuffer mit 0,050 ml des in Schritt eins hergestellten Standards im ersten Gefäß vermengten. Die übrigen sieben Gefäße wurden mit jeweils 0.300 ml Verdünnungspuffer befüllt. Nun wurde, ausgehend vom ersten Eppendorfgefäß, 0.300 ml von einem in das nächste Gefäß pipettiert, um absteigend Standardkonzentrationen von 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 und 7.8 pg/ml zu erhalten. Im letzten Gefäß wurde ausschließlich der Verdünnungspuffer belassen, der einer Mengenangabe von 0 pg / ml entspricht.

Im folgenden Schritt wurden die ELISA – Platten so vorbereitet, dass in die ersten beiden Mikrotiterstreifen, identisch von oben nach unten, die Verdünnungsreihe zu jeweils 0.100 ml eingefüllt wurde. Der Übersichtlichkeit halber beließen wir zwischen den weiteren ELISA – Streifen einen Abstand von einer Reihe und pipettierten in die einzelnen Mikroküvetten, der Reihenfolge nach, 0.100 ml Probe. In jede dieser Küvetten gaben wir 0.050 ml Biotin Conjugate Human IL – 4, vermischten den Inhalt durch Beklopfen derselben, um daraufhin die gesamte ELISA – Platte mit einer Abdeckfolie zu verschließen und zwei Stunden bei Raumtemperatur zu inkubieren.

In der Zwischenzeit stellten wir den Waschpuffer und das Streptavidin – HRP her. Dazu wurden 20 ml des 25 X Waschpufferkonzentrates mit 480 ml destilliertem H₂O aufgefüllt und in Spritzflaschen verteilt, während wir 0.080 ml 100 X Human IL – 4 Streptavidin HRP mit 8 ml Streptavidin HRP Diluent mischten.

Nach der Inkubationszeit entfernten wir die Abklebefolie, entleerten den Inhalt der Mikrotiterstreifen und wuschen mittels Spritzflaschen jede einzelne Küvette vier mal aus. Anschließend wurde die ELISA – Platte mit 0.100 ml Streptavidin – HRP pipettiert, erneut mit Abklebefolie bedeckt und 30 Minuten lang stehen gelassen.

Daraufhin folgte ein vierfacher Waschvorgang mit dem Waschpuffer und die Zugabe von 0.100 ml stabilisiertem Chromogen, das eine Farbreaktion nach blau bewirken sollte. Nun wurde die ELISA – Platte erneut abgedeckt und in einer Schublade unter Lichtausschluss für etwa 20 Minuten inkubiert. Im Anschluss an diese Wartezeit führten wir den einzelnen Mikroküvetten 0.100 ml Stopplösung zu, die daraufhin einen Farbumschlag nach gelb zur Folge hatte (s. Abb. 7).

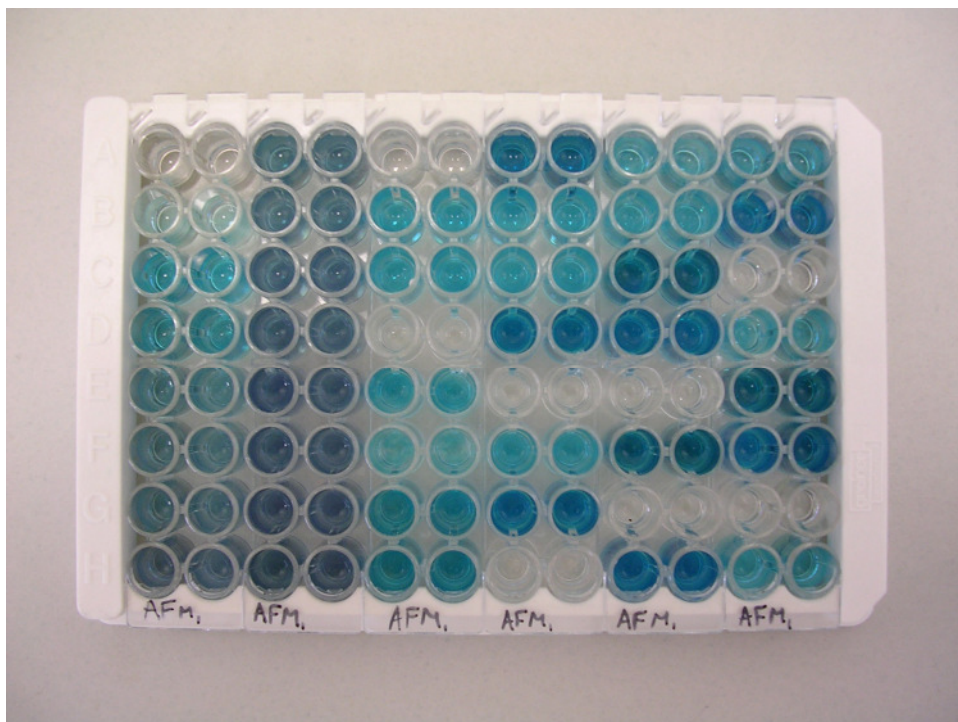


Abbildung 7: ELISA-Platte [18]

Diese Gelbfärbung ließ nun eine quantitative Auswertung über die optische Dichte im Spektralfotometer zu. Hierfür verwendeten wir einen Messfilter der Wellenlänge 450 nm und setzten diese Wellenlänge in Bezug zu einer Referenzwellenlänge von 492 nm. Den darauf folgenden Computerausdruck zogen wir zur Interleukinmengenbestimmung heran (s. Abb. 8).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	.050	.032	.042	.042	.048	.053	.049	.045	.178	.050	.046	.050	A
B	2.152	2.121	.040	.122	.041	.039	.046	.021	.046	.115	.046	.045	B
C	1.331	1.320	.169	.043	.036	.064	.038	.045	.048	.053	.064	.064	C
D	.701	.709	.050	1.252	.270	.191	.040	.040	.023	.042	.048	.041	D
E	.361	.389	.055	.038	.057	.041	.039	.045	.039	.048	.152	.046	E
F	.222	.215	.042	.027	.041	.096	.036	.038	.049	.417	.098	.046	F
G	.140	.135	.270	.047	.093	.053	.052	.049	.051	.060	.151	.048	G
H	.093	.106	.051	.052	.049	.049	.057	.050	.050	.060	.070	.054	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Abbildung 8 : Spektralfotometerausdruck (eigene Untersuchung)

2.7.3 Interleukin – 10 Nachweis

Alle im IL – 10 Kit enthaltenen Reagenzien wurden gründlich gevortext. Dann wurde der Standard mit 2.29 ml Standardpufferlösung gemischt, um eine Konzentration von 10.000 pg/ml zu erhalten, zehn Minuten stehen gelassen und innerhalb von einer Stunde verwendet. Für die Standardverdünnungsreihe wurden acht Eppendorfgefäße herangezogen. Im ersten vermengten wir 0.450 ml Standardpuffer mit 0.050 ml im ersten Schritt erstellten Standard und gaben jeweils 0.200 ml Verdünnungspuffer in die übrigen sieben Gefäße. Nun entnahmen wir 0.200 ml Lösung aus dem ersten Gefäß und pipettierten sie in das darauf folgende und verfahren mit dem Pipettieren so, bis wir am letzten Gefäß angelangt waren. Es ergab sich somit eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 und 0 pg/ml.

Im folgenden Schritt wurde die ELISA – Platte vorbereitet. Die ersten beiden Mikrotiterstreifen belegte die Standardverdünnungsreihe, zwischen den übrigen Streifen entfernten wir zur besseren Übersichtlichkeit jeweils einen Streifen und befüllten die verbliebenen Streifen mit jeweils 0.050 ml Probenlösung.

In jede Mikroküvette gaben wir anschließend 0.100 ml Biotin Conjugate Human IL – 10, vermischten dieses mit dem Inhalt durch Beklopfen der Platte und deckten diese für zwei Stunden mit einer Abklebefolie ab.

In der Zwischenzeit stellten wir den Waschpuffer und das Streptavidin – HRP her. Hierzu füllten wir 20 ml 25 X Waschpufferkonzentrat mit 480 ml destilliertem H₂O auf und verteilten den Waschpuffer auf Spritzflaschen. Um das Streptavidin – HRP zu erhalten, mischten wir 0.080 ml Human IL – 10 Streptavidin-HRP mit 8 ml Streptavidin HRP-Verdünner.

Für den ersten Waschvorgang entfernten wir die Folie, spritzten die Küvetten viermal mit Waschpuffer aus und klopfen die Platte anschließend auf Zellstoff aus.

Nun pipettierten wir in die Mikroküvetten 0.100 ml Streptavidin – HRP, klebten die Platte mit Folie ab und ließen diese eine halbe Stunde lang stehen.

Nach einem zweiten Waschvorgang, welcher dem ersten glich, bewirkten wir in den Proben und Standards durch Zugabe von 0.100 ml stabilisiertem Chromogen einen Farbumschlag nach blau. Danach wurde die ELISA – Platte erneut abgedeckt und im Dunklen 20 Minuten lang inkubiert.

Mit der nun folgenden Zugabe von 0.100 ml Stopplösung wechselte die Farbe von blau nach gelb und ließ somit eine quantitative Auswertung im Fotometer zu. Dazu führten wir die Platte in das Spektralfotometer ein und maßen die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 492 nm.

2.7.4 Interleukin – 12 Nachweis

Zu Beginn wurden die im IL – 12 - Kit enthaltenen Reagenzien gevortext. Daraufhin musste die IL – 12 - Standardlösung mit einer Konzentration von 5000 pg/ml hergestellt werden. Dies geschah über die Lösung des im Kit enthaltenen Standards in 0.600 ml Standardlösungspuffer. Nach zehnminütiger

Wartezeit verwendeten wir die angesetzte Standardlösung innerhalb von einer Stunde.

Für die Standardverdünnungsreihe verwendeten wir acht Eppendorfgefäße, wobei im ersten 0.100 ml hergestellte Standardlösung mit 0.900 ml Verdünnungspuffer gemischt wurde und in die sieben weiteren Gefäße jeweils 0.200 ml Verdünnungspuffer gegeben wurde, welcher im letzten Gefäß in reiner Form verblieb. Ausgehend vom ersten Gefäß wurden nun jeweils 0.200 ml entnommen und im nächsten wieder abgegeben. Somit erhielten wir eine Verdünnungsreihe der Konzentrationen 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 und 0 pg/ml.

Die ELISA – Platte wurde nun entsprechend den beiden vorhergehenden Interleukinbestimmungen vorbereitet und mit jeweils 0.050 ml Probe beimpft. In jede Mikroküvette wurde anschließend 0.100 ml Biotin Conjugate Human IL – 12 zupipettiert, abgedeckt und zwei Stunden lang inkubiert. In der Zwischenzeit stellten wir den Waschpuffer und das Streptavidin – HRP wie bei der IL – 4 und IL – 10 Bestimmung her.

Nach Ablauf der zweistündigen Inkubationszeit erfolgte der erste Waschvorgang, indem wir die ELISA – Platte viermal sorgfältig mit Waschpuffer ausspülten und auf Zellstoff sorgfältig ausklopften. Im nächsten Schritt gaben wir 0.100 ml Streptavidin – HRP hinzu und ließen dieses 30 Minuten lang einwirken. Nach dem anschließenden zweiten Waschvorgang erreichten wir durch Zugabe von 0.100 ml stabilisiertem Chromogen eine blaue Einfärbung der Lösung.

Es folgte eine letztmalige 20-minütige Inkubation unter Lichtausschluss. Um einen Farbumschlag nach gelb zu erhalten, pipettierten wir den Standards und Proben jeweils 0.100 ml Stopplösung zu. Nun konnten wir den Interleukingehalt über die Messung der optischen Dichte im Spektralfotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm und der Referenzwellenlänge von 492 nm bestimmen.

2.8 Auswertung der Interleukinbestimmung

Um die Probenkonzentrationen der Interleukine 4, 10 und 12 in pg/ml zu erhalten, zogen wir die Werte der optischen Dichte der jeweiligen Proben aus dem Spektralfotometerausdruck (s. Abb. 8) heran. Für die Umrechnung verwendeten wir das Computerprogramm Excel von Microsoft.

Die Standardinterleukinkurve wurde für jedes einzelne Interleukin getrennt berechnet. Mit Hilfe dieser Kurve konnten die einzelnen Konzentrationen der Proben abgelesen werden. Hierzu trugen wir in die Spalten „Optische Dichte 1“ und „Optische Dichte 2“ der nachfolgenden Tabelle 3 die optischen Dichten der beiden Verdünnungsreihen ein, von denen die Konzentrationen wie in Spalte Konz (pg/ml) angegeben, ja bereits bekannt waren.

Tabelle 3 Auszug der Analyse mittels Excel für das Interleukin 4

Stand	Inter	IL-4			
Reihe	Reihe	Optische Dichte 1	Optische Dichte 2	Mittel-Wert	Konz [pg/ml]
		2.227	2.223	2.225	500
		1.485	1.454	1.470	250
		0.820	0.776	0.798	125
		0.442	0.411	0.427	62.5
		0.211	0.209	0.210	31.2
		0.122	0.114	0.118	15.6
		0.066	0.064	0.065	7.8
		0.009	0.006	0.008	0

Mittels der nun errechneten Standardkurvengleichung (s. Abb. 9) konnten wir die Variablen der Standardinterleukinkurve für das jeweilige Interleukin, wie in Tabelle 3 angegeben, angleichen.

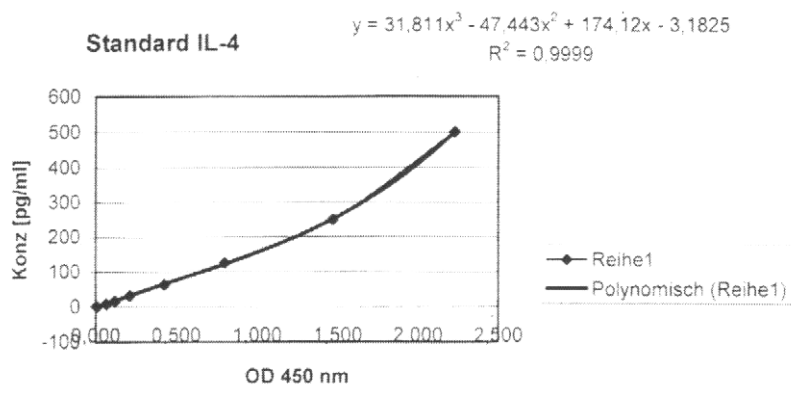


Abbildung 9: Im Computerprogramm Excel erstellte Standardkurve für Interleukin 4

In der abschließenden Tabelle des Computerprogramms Excel gaben wir in der Spalte „Proben“ die zugehörige Probennummer und in der Spalte „Mittelwert“ den Wert der jeweiligen optischen Dichte ein. Das Programm errechnete daraufhin die Probenkonzentration in pg/ml und gab diese in der letzten Spalte an (siehe Tabelle 4).

Ergab sich für ein Interleukin ein negativer Wert, wurde dieser von uns in der statischen Auswertung gleich Null gesetzt.

Tabelle 4 Eingabe der optischen Dichte in das Programm Excel und Berechnung der zugehörigen Probenkonzentration

Proben	OD1	OD2	Mittelwert	Proben Konz [pg/ml]
L2			0.030	2.0
L6			0.160	23.6
L9			0.060	7.1
L13			0.044	4.4
L15			0.039	3.5
L17			0.042	4.0
L19			0.044	4.4
L22			0.113	15.9
L24			0.029	1.8
L26			0.060	7.1
L28			0.035	2.9
L30			0.028	1.7
L32			0.018	-0.1
L41			0.038	3.4
L43			0.031	2.2

2.9 Statistische Analyse

In unserer Studie wurde eruiert, ob sich über die Zytokin- Konzentrationen von IL-4, IL-10 und IL-12 Unterschiede in der oralen und vaginalen Immunreaktion bezüglich einer Candida spp. Infektion finden lassen.

Bei der nicht-normalen Verteilung wurde eine nicht-parametrische Analyse durchgeführt.

Mittels des gepaarten Wilcoxon-Test verglichen wir bei jeder Patientin die Immunreaktion der verschiedenen anatomischen Bereiche (Mund, Vagina).

Für den Test auf Gruppenunterschiede der Differenzen zwischen Mundprobe und vaginaler Probe wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

Die Testergebnisse wurden mit einem p-Wert von $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

Die Auswertung erfolgte mit der Software SYSTAT V10 (Systat Software Incorporation).

3 Ergebnisse

3.1 Patientinnen

Der Reinheitsgrad der Vaginalproben wurde mittels mikroskopischer Untersuchung in Grad 1, 2 oder 3 eingeteilt. Der Reinheitsgrad trifft eine Aussage über den unterschiedlichen Erreger- und Zellgehalt des Scheidensekrets. Reinheitsgrad 1 bezeichnet die normale Döderlein-Flora ohne sonstige Bakterien, Reinheitsgrad 2 eine Mischflora und Reinheitsgrad 3 eine Bakterienflora mit zahlreichen Leukozyten [102]. Sowohl beim Alter als auch beim Reinheitsgrad waren keine Gruppenunterschiede festzustellen. Diese Ergebnisse sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5 Einteilung der Patientinnen nach Alter und Reinheitsgrad der Vaginalproben (Mediane)

<u>Gruppe</u>	<u>Alter</u>	<u>Reinheitsgrad</u>	<u>Anzahl n</u>
1 (n=33)	39,00	1,00	7/33
2 (n=8)	40,00	1,00	1/8
3 (n=25)	40,00	2,00	4/25
4 (n=76)	42,00	1,00	19/76

Die von uns in 2.2.1. untersuchten Symptome sind in den folgenden Tabellen 6 und 7 getrennt nach den Patientinnen-Gruppen 1-4 (s. Tabelle 2) dargestellt. Für die Testergebnisse erfolgt die Angabe des p-Wertes. Dieser wird mit $p < 0,05$ als statistisch signifikant bewertet.

Tabelle 6 Auswertung des Anamnesefragebogens

	Gruppe 1(n=)	Gruppe 2(n=)	Gruppe 3(n=)	Gruppe 4(n=)	Total (n=)	p-Wert
Schwangerschaft						0,238
Keine Angabe	2	1	4	15	22	
Positiv	5	0	3	3	11	
Negativ	26	7	18	58	109	
Total	33	8	25	76	142	
Leukozyten in der Vaginalprobe						0,261
Positiv	0	0	0	4	4	
Negativ	31	7	21	57	116	
Total	31	7	21	61	120	
Parodontal-therapie						0,178
Positiv	7	2	6	27	42	
Negativ	24	5	15	34	78	
Total	31	7	21	61	120	
Professionelle Zahnreinigung						0,929
Positiv	15	4	9	29	57	
Negativ	16	3	12	32	63	
Total	31	7	21	61	120	
Gastrointestinale Beschwerden						0,673
Positiv	5	2	2	9	18	
Negativ	26	5	21	52	102	
Total	31	7	21	61	120	
Pilzerkrankungen						0,974
Positiv	15	3	9	29	56	
Negativ	16	4	12	32	64	
Total	31	7	21	61	120	
Mundtrockenheit						0,153
Positiv	6	0	1	4	11	
Negativ	25	7	20	57	109	
Total	31	7	21	61	120	
Mundgeruch						0,126
Positiv	4	0	2	1	7	
Negativ	27	7	19	60	113	
Total	31	7	21	61	120	

Etwa 8% des Studienkollektivs (s. Tabelle 6) waren zum Zeitpunkt der Untersuchung schwanger ($11/142=7,75\%$), wobei der Prozentsatz in allen Gruppen vergleichbar ist, mit einem leicht erhöhten Anteil in Gruppe 1 ($5/33=15,15\%$).

Leukozyten wurden ausschließlich in den Vaginalproben der Gruppe 4 (keine positive Pilzkultur oral/vaginal) gefunden, die größte Anzahl der Patientinnen wies keinen positiven Befund auf.

Eine Parodontaltherapie wurde bei $1/3$ ($42/120=35\%$) der Patientinnen durchgeführt, am häufigsten in Gruppe 4 ($27/61=44,26\%$).

Die professionelle Zahnreinigung wurde von etwa der Hälfte aller Patientinnen ($57/120=47,50\%$) in Anspruch genommen, ohne feststellbare Besonderheit in einer der Gruppen ($p\text{-Wert}=0,929$).

Gastrointestinale Beschwerden traten bei ca. 15 % aller untersuchten Patientinnen auf ($18/120=15\%$). Auch bei diesem Parameter sind keine Hinweise auf Gruppenunterschiede zu finden ($p\text{-Wert}=0,673$).

Etwa die Hälfte der Patientinnen ($56/120=46,67\%$) litt an Pilzerkrankungen, unabhängig von ihrer Gruppenzugehörigkeit ($p\text{-Wert}=0,974$).

Mundtrockenheit trat bei 10 % ($11/120=9,16\%$) des Studienkollektivs auf, mit einem erhöhten Anteil in Gruppe 1 ($6/31=19,35\%$).

6 % der Patientinnen berichtete über Mundgeruch, mit leicht gehäuftem Auftreten in Gruppe 1 ($4/31=12,90\%$).

Als häufigstes Symptom (s. Tabelle 7) trat mit über 80 % vaginales Brennen und Jucken auf, wobei jeweils $1/3$ der Patientinnen Brennen und Jucken alleine oder in Kombination mit Fluor bzw. Fluor und Rötung angab, unabhängig von der Gruppenzuordnung ($p=0,9$).

Tabelle 7 Auswertung der Symptome (p-Wert=0,907)

	Gruppe 1 (n=)	Gruppe 2 (n=)	Gruppe 3 (n=)	Gruppe 4 (n=)	Total (n=)
Brennen+Jucken & Fluor & Rötung	6	2	1	11	20
Brennen+Jucken	2	2	3	8	15
Brennen+Jucken & Fluor	3	1	4	7	15
Fluor	2	2	1	3	8
Fluor & Rötung	0	0	0	2	2
Keine Angabe	2	1	4	14	21
Total	15	8	13	45	81

Anamnestisch sind die Gruppen also vergleichbar hinsichtlich Alter, Reinheitsgrad, durchgeführter professioneller Zahnreinigung, gastrointestinaler Beschwerden und den Symptomen wie Brennen und Jucken, Fluor und Rötung. Ein Trend zur Ungleichverteilung liegt vor mit Schwerpunkt auf Gruppe 1 bezüglich Schwangerschaft, Mundtrockenheit und Mundgeruch sowie einem Schwerpunkt auf Gruppe 4 beim Auftreten von Leukozyten und erfolgter Parodontaltherapie.

Im Rahmen des Fragebogens bestimmten wir auch das Vorhandensein von Allergien und die gestellten Diagnosen.

Im Ergebnis litten 25% der Patientinnen unter einer Allergie, wobei diese nur bei 11% spezifiziert wurde. Als häufigste Diagnose gaben die Patientinnen eine chronisch rezidivierende Vulvovaginalcandidose (CRVVC) (56%), oder eine CRVVC in Kombination mit zusätzlichen Diagnosen an (11 %). Bei weiteren 10 % der Patientinnen lag eine akute Pilzinfektion vor, 8 % litten an einer bakteriellen Vaginose und 7 % an einer bakteriellen Dysbiose.

3.2 Candidanachweis

Für den oralen und vaginalen Nachweis einer Infektion mit *Candida* spp. wurde eine kulturelle Anzucht auf Sabouraud-Agarplatten durchgeführt. Bei positiven Ergebnissen erfolgte ein weiterer Ausstrich auf Chrom-Agarplatten um eine spezifischere Unterteilung zu erhalten.

Mittels entsprechender Farbreaktion (siehe 2.2.2.) konnte zwischen *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida kefyr*, *Candida krusei* und *Candida tropicalis* unterschieden werden.

3.2.1 Candidanachweis in den Vaginalproben

In den Vaginalproben der Patientinnen wurde durch kulturelle Anzucht am häufigsten *C. albicans* gefunden (n=25/18,2%). Ebenfalls mehr als einmal wurde *C. glabrata* (n=5/3,6%) und die Kombination *C. glabrata* und *C. albicans* (n=2/1,5%) festgestellt.

Die Verteilungen waren stark gruppenabhängig, da das Ergebnis der Kultur zur Einteilung der Gruppen verwendet wurde. Dementsprechend traten keine positiven Vaginalbefunde in den Gruppen 2 und 4 auf.

Tabelle 8 Ergebnisse der positiven Candidabefunde der Vaginalproben durch kulturelle Anzucht auf Chromagar

	Gruppe 1, n (%)	Gruppe 2, n (%)	Gruppe 3, n (%)	Gruppe 4, n (%)
<i>C. albicans</i> (n=25)	16 (11,7)	0	9 (6,6)	0
<i>C. albicans</i> & <i>C. glabrata</i> (n=2)	2 (1,5)	0	0	0
<i>C. glabrata</i> (n=5)	5 (3,6)	0	0	0
<i>C. kefyr</i> (n=1)	1 (0,7)	0	0	0
<i>C. krusei</i> (n=1)	1 (0,7)	0	0	0
Candida negativ (n=103)	7 (5,1)	8 (5,8)	16 (11,7)	72 (52,6)

3.2.2 Candidanachweis in den Mundproben

Der in den Mundproben der Patientinnen am häufigsten mittels kultureller Anzucht gefundene Pilz war *C. albicans* (n=27/19,6%), gefolgt von *C. glabrata* (n=8/5,8%) und der Kombination aus *C. albicans* und *C. glabrata* (n=4/2,9%).

C. kefyr und *C. krusei* wurden in jeweils einer Probe nachgewiesen (n=1, 0,7%). Entsprechend der Aussage der vaginalen Befunde (siehe 3.2.1.) traten bei den Pilzkulturen der Mundbefunde keine positiven Befunde in den Gruppen 3 und 4 auf. Diese Ergebnisse bestätigen die Richtigkeit der Gruppenzuordnung und der Umformungen im Rahmen der Auswertung.

Tabelle 9 Ergebnisse der positiven Candidabefunde der Mundproben durch kulturelle Anzucht auf Chromagar

	Gruppe 1, n (%)	Gruppe 2, n (%)	Gruppe 3, n (%)	Gruppe 4, n (%)
<i>C. albicans</i> (n=27)	22 (15,9)	5 (3,6)	0	0
<i>C. albicans</i> & <i>C. glabrata</i> (n=4)	4 (2,9)	0	0	0
<i>C. glabrata</i> (n=8)	5 (3,6)	3 (2,2)	0	0
<i>C. kefyr</i> (n=1)	1 (0,7)	0	0	0
<i>C. krusei</i> (n=1)	1 (0,7)	0	0	0
<i>C. negativ</i> (n=97)	0	0	25 (18,1)	72 (52,2)

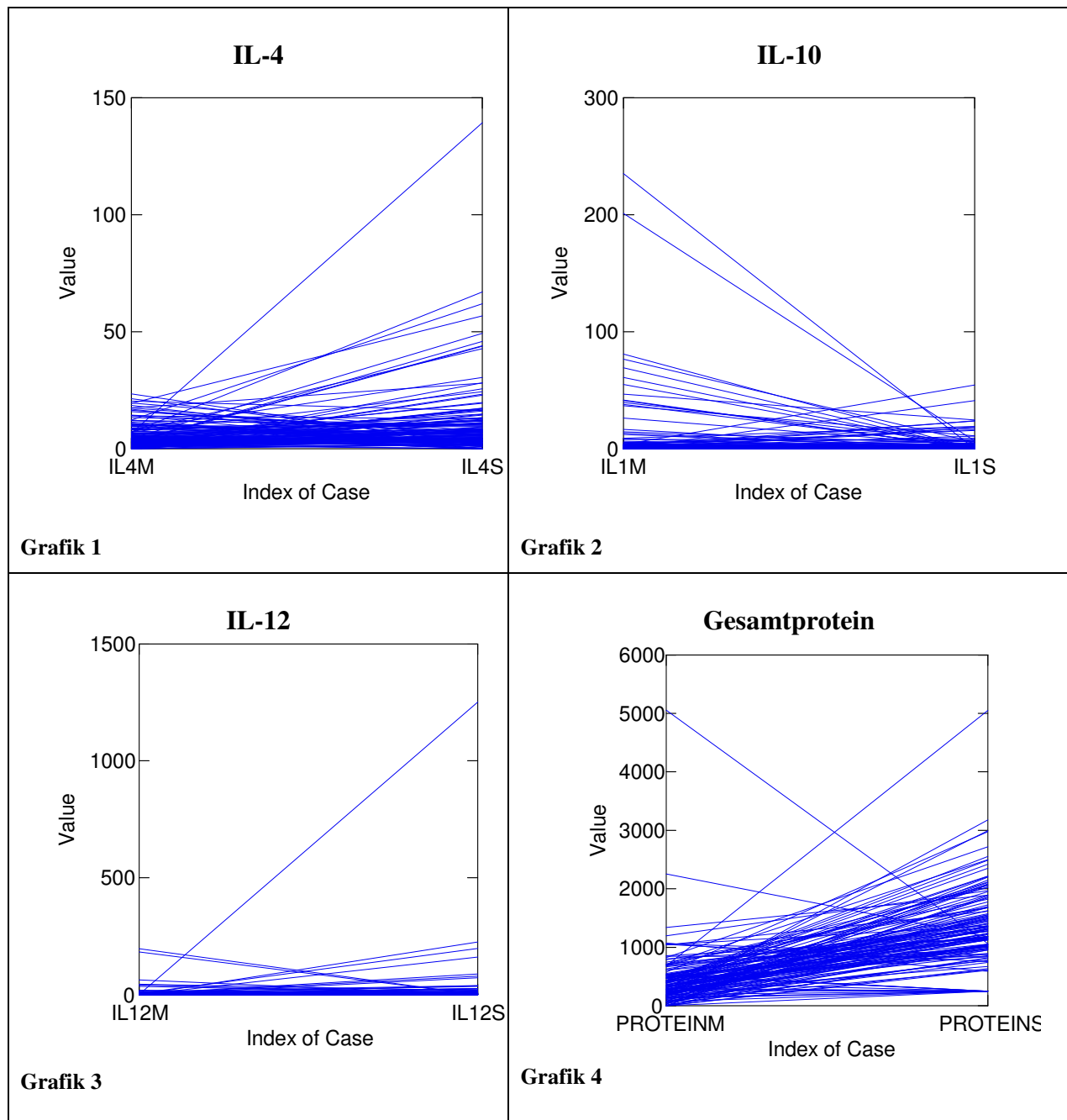
3.3 Auswertung der Zytokinbestimmung mittels ELISA

3.3.1 Ergebnisse der Bestimmung von IL-4, IL-10, IL-12 und des Gesamtproteingehaltes

Vergleicht man nun ohne Gruppenaufteilung das Gesamtkollektiv hinsichtlich der intraindividuellen Unterschiede zwischen Mundbesiedelung (M) und Scheidenbesiedelung (S), veranschaulicht durch die Steigungen der Geraden (Verbindungsline zwischen Konzentration in Mund- und Vaginalprobe einer Patientin) in den Change-Grafiken (Grafiken 1 – 4), fallen in allen Variablen die Extremwerte auf. Diese bestätigen eindeutig die Wahl der nicht-parametrischen Auswertung.

Klar ersichtlich in den Grafiken ist ein deutlich höherer Proteingehalt der Vaginalproben gegenüber dem der Mundproben (Grafik 4).

Zur Bestimmung des p-Wertes zogen wir den Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon für gepaarte Stichproben heran.



Grafik 1-4 Konzentrationen von IL-4, IL-10, IL-12 und dem Gesamtproteingehalt in pg/ml (y-Achse) für Mund (M) und Scheide (S)

Der Gesamtproteingehalt war in der Vagina signifikant höher als im Mundraum ($p < 0,001$) (Tabelle 10). Ebenfalls signifikant erhöht waren die Konzentrationen von IL-4 ($p < 0,001$) und IL-12 ($p < 0,001$) in den Vaginalproben, für IL-10 hingegen ergab sich ein p-Wert von $p < 0,510$ (Tabelle 10).

Tabelle 10 fasst die Ergebnisse des Vorzeichen-Rang-Tests von Wilcoxon für gepaarte Stichproben zusammen. In dieser Auswertung wird den Konzentrationsdifferenzen von Mund- und Vaginalprobenwert jeweils ein Größenrang zugeordnet und anschließend eine Rangsumme gebildet. Aus dieser wird über eine Formel der Z-Wert (Tabelle 10) berechnet, aus dem wiederum der zugehörige p-Wert über eine Tabelle abgelesen werden kann.

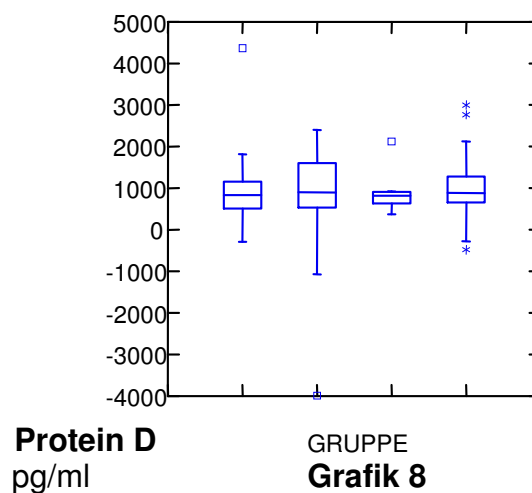
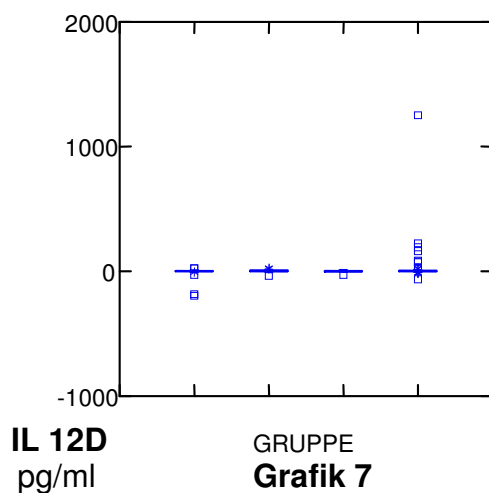
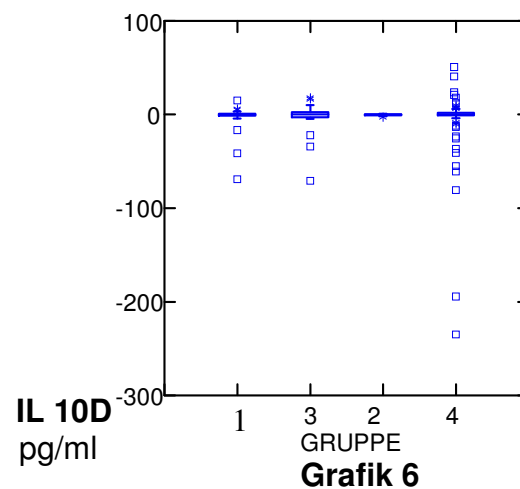
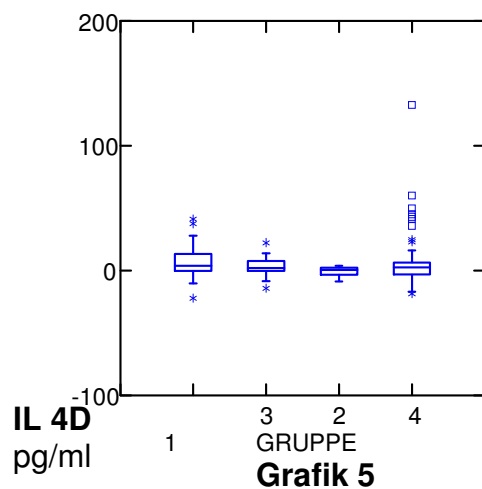
Tabelle 10 Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für die Konzentrationsunterschiede von IL-4, IL-10, IL-12 und dem Gesamtprotein zwischen Mund und Vagina

	Z-Wert	p-Wert
IL-4	3,874	<0,001
IL-10	-0,659	0,510
IL-12	5,432	<0,001
Gesamtprotein	9,616	<0,001

3.3.2 Auswertung der Interleukine nach Gruppen

In einem weiteren Schritt untersuchten wir, inwieweit sich die einzelnen Gruppen (s. Tabelle 2) bezüglich IL-4, IL-10, IL-12 und dem Gesamtproteingehalt unterscheiden.

Zur Vereinfachung wurden die Differenzen aus Vaginal- und Mundprobe gebildet (z. B. IL-4 Konzentration in Vaginalprobe – IL-4 Konzentration in Mundprobe = IL-4D), d. h. positive Werte zeigen einen höheren Wert in der Vaginalprobe an. Die in 3.3.1. gefundenen generellen Tendenzen lassen sich auch in dieser Darstellung erkennen (Grafiken 5-8).



Grafik 5-8 Gruppenunterschiede der Konzentrationsdifferenzen in pg/ml für IL-4D, IL-10D, IL-12D und dem Gesamtproteingehalt

Für die Darstellung der Grafiken wurden so genannte Boxplots verwendet, deren Boxen jeweils 50% der Wertemenge enthalten und deren Mittelstrich den jeweiligen Median angibt. Die Einzelsymbole und Linien nach oben und unten geben den Bereich der Extremwerte an.

In diesen Grafiken sind erhöhte Konzentrationswerte der Vaginalproben bei IL-4 (Grafik 5) und dem Gesamtprotein (Grafik 8) deutlich erkennbar. Bezüglich IL-10 (Grafik 6) und IL-12 (Grafik 7) sind aufgrund der weiten Streuung der Werte aus den Grafiken keine deutlichen Unterschiede zu erkennen.

Eine unterschiedliche Reaktion von Mundraum und Vagina würde vor allem durch einen Vergleich der Gruppe 3 (vaginal positiv, oral negativ) mit Gruppe 2 (vaginal negativ, oral positiv) auffallen.

Erschwert wird dieser Vergleich durch die geringe Patientinnenanzahl in Gruppe 2 (n=8). Allerdings kann auch ein Unterschied zwischen Gruppe 1 (vaginal positiv, oral positiv) und Gruppe 3 (vaginal positiv, oral negativ) auf eine unterschiedliche Immunreaktion zwischen Mundraum und Vagina schließen lassen.

Bei IL-4 (Grafik 5) zeichnet sich ein Unterschied zwischen Gruppe 2 und Gruppe 3 ab. IL-10 (Grafik 6) lässt hingegen keine Gruppenunterschiede erkennen.

In Grafik 7 ist eine Umkehr der Konzentrationsunterschiede bezüglich IL-12 zwischen Gruppe 1 und Gruppe 4 offensichtlich. Aus Grafik 8 lässt sich ableiten, dass sich beim Gesamtproteingehalt weder zwischen Gruppe 1 und Gruppe 4, noch zwischen Gruppe 1 und Gruppe 3 eine unterschiedliche Immunreaktion zwischen Mundraum und Vagina abzeichnet. Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests konnten wir diese Eindrücke quantitativ verifizieren (Tabelle 11).

Tabelle 11 Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests für die Konzentrationsunterschiede zwischen Vagina und Mund für IL-4D, IL-10D, IL-12D und GesamtproteinD

	Gruppe 1 (n=)	Gruppe 2 (n=)	Gruppe 3 (n=)	Gruppe 4 (n=)	p-Wert
IL-4D	33	8	25	76	0,284
IL-10D	32	8	25	74	0,692
IL-12D	33	8	25	76	0,353
GesamtproteinD	32	8	25	76	0,642

Der Kruskal-Wallis-Test (Tabelle 11) bestätigt, dass sich die Gruppen bezüglich der Konzentrationsdifferenzen zwischen Vagina und Mund, beim Gesamtprotein (p=0,642) und IL-10 (p=0,692) nicht unterscheiden. Die p-Werte von 0,284 für

IL-4 und 0,353 für IL-12 sind zwar ebenfalls weit vom 0,050- Signifikanzniveau entfernt, deuten aber an, dass hier die Verhältnisse anders liegen könnten.

Um diesen Hinweisen weiter nachzugehen, verglichen wir die Gruppen 1-4 paarweise.

3.3.2.1 Vergleich von Gruppe 1 mit 3

Tabelle 12 Vergleich der Konzentrationsunterschiede zwischen Vagina und Mund für die Gruppen 1 und 3

	Gruppe 1 (n=)	Gruppe 3 (n=)	p-Wert
IL-4D	33	25	0,358
IL-10D	32	25	0,815
IL-12D	33	25	0,251
GesamtproteinD	32	25	0,359

In einem Vergleich der Gruppe 1 (vaginal positiv/ oral positiv) mit Gruppe 3 (vaginal positiv/ oral negativ) bezüglich der Konzentrationsunterschiede zwischen Vagina und Mund können Unterschiede der Immunreaktion durchaus sichtbar werden.

Es zeigt sich deutlich, dass IL-10 hinsichtlich Mundraum und Vagina keine Unterschiede aufweist ($p=0,815$) (Tabelle 12). Für IL-4 ($p=0,358$), IL-12 ($p=0,251$) und dem Gesamtprotein ($p=0,359$) lassen sich Unterschiede nicht gänzlich ausschließen, allerdings sind die p-Werte weit vom 5% -Signifikanzniveau entfernt.

3.3.2.2 Vergleich von Gruppe 2 mit 3

Tabelle 13 Vergleich der Konzentrationsunterschiede zwischen Vagina und Mund für die Gruppen 2 und 3

	Gruppe 2 (n =)	Gruppe 3 (n =)	p-Wert
IL-4D	8	25	0,179
IL-10D	8	25	0,766
IL-12D	8	25	0,303
GesamtproteinD	8	25	0,674

Die Organdifferenzen zwischen Vagina und Mund zeigten im Vergleich von Gruppe 2 (vaginal negativ/ oral positiv) mit Gruppe 3 (vaginal positiv/ oral negativ) bezüglich IL-10 (p-Wert=0,766) (Tabelle 13) und dem Gesamtprotein (p-Wert=0,674) erwartungsgemäß keinen Unterschied.

Allerdings lassen die Vergleichswerte von IL-12 (p-Wert=0,303) und vor allem von IL-4 (p-Wert=0,179) einen Rückschluss auf unterschiedliche Immunreaktionen von Vagina und Mund zu. Die p-Werte liegen allerdings weit vom Signifikanzniveau 0,050 entfernt.

3.3.2.3 Vergleich von Gruppe 1 mit 4

Tabelle 14 Vergleich der Konzentrationsunterschiede zwischen Vagina und Mund für die Gruppen 1 und 4

	Gruppe 1 (n =)	Gruppe 4 (n =)	p-Wert
IL-4D	33	76	0,203
IL-10D	32	74	0,307
IL-12D	33	76	0,147
Gesamtprotein	32	76	0,236

Abschließend haben wir die Gruppe 1 (vaginal positiv/ oral positiv) mit Gruppe 4 (vaginal negativ/ oral negativ) verglichen, um der Frage nachzugehen, ob eine Hefepilzbesiedelung die Konzentrationen von IL-4, IL-10, IL-12 und dem Gesamtprotein verändert. Allerdings zeigen die p-Werte (Tabelle 14) keine klaren Ergebnisse, sondern deuten nur vage Unterschiede an. Der niedrigste p-Wert wurde für IL-12 gemessen (p-Wert=0,147), gefolgt von IL-4 (p-Wert=0,203). Beide p-Werte liegen allerdings abseits des Signifikanzniveaus von 0,050.

3.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Zytokinbestimmung

Am aussagekräftigsten ist für die Frage, ob sich anhand der Zytokin-konzentrationen von IL-4, IL-10 und IL-12 mögliche Unterschiede in der Immunreaktion von Vagina und Mund bezüglich einer *Candida* spp. Infektion finden lassen, ein Vergleich der Konzentrationsdifferenzen von Gruppe 2 (vaginal negativ/ oral positiv) mit Gruppe 3 (vaginal positiv/ oral negativ).

Für Gruppe 2 stehen allerdings lediglich 8 Patienten zur Verfügung. Deshalb ist hier bezüglich IL-4 mit einem p-Wert von 0,179 (Tabelle 13) durchaus ein Hinweis für einen Unterschied zwischen Mundraum und Vagina gegeben, wobei die Konzentrationsunterschiede zwischen Mund und Vagina bei Gruppe 2 kleiner sind als bei Gruppe 3.

Tabelle 15

Vergleich der Interleukine 4, 10 und 12 und dem Gesamtprotein über die Konzentrationsunterschiede zwischen Mund und Vagina und Gruppeneinteilung

	Gruppe 1 Median pg/ml (Spanne) (n=)	Gruppe 2 Median pg/ml (Spanne) (n=)	Gruppe 3 Median pg/ml (Spanne) (n=)	Gruppe 4 Median pg/ml (Spanne) (n=)
IL-4D	3,679 (40,994- -22,184) (33)	0,555 (3,883- -8,677) (8)	2,034 (22,138- -14,276) (25)	2,545 (132,635- -18,681) (76)
IL-10D	-0,241 (15,027- -69,260) (32)	0,000 (0,524- -2,914) (8)	0,000 (17,740- -70,974) (25)	0,000 (50,951- -235,060) (74)
IL-12D	1,720 (24,427- -196,717) (33)	1,620 (11,831- -27,094) (8)	2,058 (26,213- -36,872) (25)	2,229 (1250,523- -63,429) (76)
Gesamtprotein	835,202 (4372,028- -289,976) (32)	819,162 (2120,756- 373,352) (8)	901,600 (2401,912- -3989,492) (25)	884,714 (2996,948- -482,944) (76)

Eine Hefepilzinfektion in Mund und Vagina bezüglich IL-4 (Gruppe 1) sollte also eine kleinere Differenz aufweisen als eine reine vaginale Infektion bezüg-

lich IL-4 (Gruppe 3). Dies ist allerdings nicht der Fall, da der Median bei Gruppe 1 bei 3,679 (Tabelle 15) und der von Gruppe 3 bei 2,034 liegt.

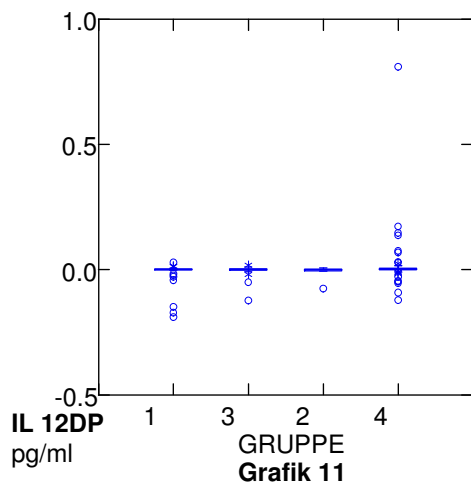
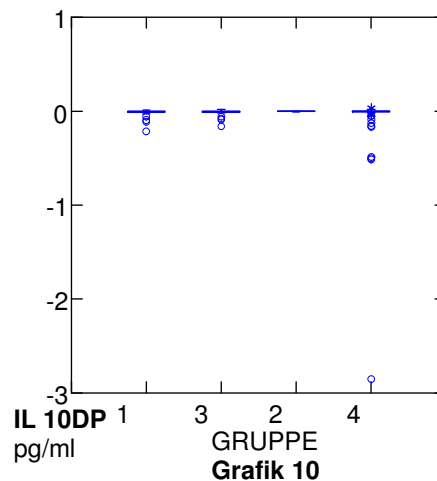
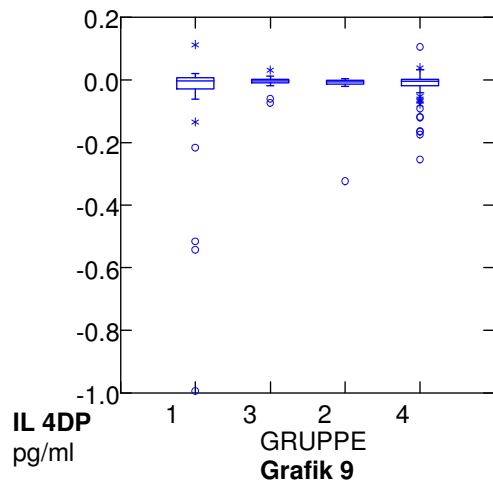
Der andere Konzentrationsunterschied zwischen Mund und Vagina, der sich bei einer Hefepilzbesiedelung ändern könnte, ist der von IL-12. Beim Vergleich der Kontrollgruppe 4 (vaginal negativ/ oral negativ) mit Gruppe 1 (vaginal positiv/ oral negativ) erzielt er einen p-Wert von 0,147 (Tabelle 14), liegt allerdings deutlich entfernt des Signifikanzniveaus von 0,050.

Die geringen und schwankenden Fallzahlen in den einzelnen Gruppen, große Streuungen, die Vielzahl von Tests und große p-Werte jenseits der Signifikanz von 0,050 lassen keine eindeutigen Schlüsse zu, dennoch ändern sich IL-4 und IL-12 möglicherweise aufgrund einer Hefepilzinfektion unterschiedlich in Vagina und Mundraum.

3.4 Auswertung der Zytokinbestimmung mittels ELISA und Normierung auf den Gesamtproteingehalt

In einem weiteren Schritt der Auswertung untersuchten wir, ob eine Normierung auf den Gesamtproteingehalt eine deutlichere Unterscheidung der Gruppen ermöglicht.

Für die Normierung wurde der Quotient Interleukin / Gesamtprotein gebildet und die Differenz, proteinnormierte Vaginalprobe minus proteinnormierter Mundprobe, berechnet (z. B. IL-4DP).



Grafik 9-11 Gruppenunterschiede der proteinnormierten Konzentrationsdifferenzen in pg/ml für IL-4DP, IL-10DP und IL-12DP

Der Differenzwert, Konzentration in der Vaginalprobe minus Konzentration in der Mundprobe, ist meist negativ, d. h. nach Normierung könnten die oralen Konzentrationen höhere Werte als die vaginalen Konzentrationen besitzen. Diese Hypothese müsste durch paarweise Tests eingehender untersucht werden. Mittel und Median der Konzentrationsdifferenzen sind wie in Tabelle 16 aufgeführt aber meist negativ.

Tabelle 16 Vergleich der Interleukine 4, 10 und 12 anhand der Konzentrationsunterschiede zwischen Vagina und Mund und Normierung auf den Gesamtproteingehalt

	Gruppe 1 Median Mittelwert pg/ml (Spanne) (n=)	Gruppe 2 Median Mittelwert pg/ml (Spanne) (n=)	Gruppe 3 Median Mittelwert pg/ml (Spanne) (n=)	Gruppe 4 Median Mittelwert pg/ml (Spanne) (n=)
IL-4DP	-0,003 -0,077 (0,112- -0,994) (31)	-0,006 -0,046 (0,004- -0,324) (8)	-0,003 -0,007 (0,031- -0,074) (23)	-0,004 -0,019 (0,105- -0,254) (73)
IL-10DP	-0,001 -0,019 (0,010- -0,216) (30)	0,000 -0,002 (0,000- -0,007) (8)	-0,002 -0,019 (0,018- -0,161) (23)	0,000 -0,071 (0,034- -2,851) (71)
IL-12DP	0,000 -0,017 (0,028- -0,189) (31)	-0,000 -0,009 (0,008- -0,0076) (8)	0,001 -0,001 (0,017- -0,124) (23)	0,001 0,016 (0,810- -0,122) (73)

3.4.1 Vergleich von Gruppe 1 mit 3

Der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test auf Gruppenunterschiede der proteinnormierten Konzentrationsdifferenzen zwischen Vagina und Mundraum zeigt p-Werte ($p=0,552/ p=0,608/ p=0,993$) (Tabelle 17) jenseits des Signifikanzniveaus von 0,050 für den Vergleich der Gruppen, die einen Unterschied zwischen Mund- und Vaginalbefall aufdecken könnten (Gruppe 1 mit 3). Somit sind keine Hinweise vorhanden, dass sich proteinnormierte Interleukin-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Lokalisation der Candidainfektion unterscheiden.

Tabelle 17 Vergleich der proteinnormierten Konzentrationsunterschiede zwischen Vagina und Mund für die Gruppen 1 und 3

	Gruppe 1 (n=)	Gruppe 3 (n=)	p-Wert
IL-4DP	31	23	0,993
IL-10DP	30	23	0,608
IL-12DP	31	23	0,552

3.4.2 Vergleich von Gruppe 2 mit 3

Ein weiterer Gruppenvergleich, der anhand der proteinnormierten Interleukine eine unterschiedliche Reaktion zwischen Mundraum und Vagina offen legen könnte, ist der Vergleich von Gruppe 2 mit Gruppe 3. Allerdings liegen auch hier die p-Werte (Tabelle 18) weitab des Signifikanzniveaus von 0,050.

Tabelle 18 Vergleich der proteinnormierten Konzentrationsunterschiede zwischen Vagina und Mund für die Gruppen 2 und 3

	Gruppe 2 (n=)	Gruppe 3 (n=)	p-Wert
IL-4DP	8	23	0,416
IL-10DP	8	23	0,552
IL-12DP	8	23	0,456

3.4.3 Vergleich von Gruppe 1 mit 4

Vergleicht man die Konzentrationsunterschiede der Gruppe mit Candidabefall an beiden Organen (Gruppe 1) mit der Gruppe ohne Befall in Vagina und Mundraum (Gruppe 4) (Tabelle 19), sind sowohl für IL-10 (p-Wert = 0,048) als auch für IL-12 (p-Wert=0,225) Unterschiede erkennbar, die relevant für eine unterschiedliche Immunreaktion von Vagina und Mundraum aufgrund einer

Candida spp.-Infektion sein könnten. Für IL-10 ist das Ergebnis signifikant mit einem p-Wert von 0,048.

Die p-Werte von IL-10 und IL-12 verhalten sich allerdings konträr zu den Werten, die aus den Boxplots in den Grafiken 10 und 11 zu erwarten wären, da sich in Grafik 11 (IL-12 DP) Gruppe 1 und Gruppe 4 deutlicher unterscheiden, als in Grafik 10 (IL-10 DP).

Aus den Kenngrößen für IL-10 und IL-12 in Tabelle 16 lässt sich ablesen, dass IL-10 in Gruppe 1, verglichen mit Gruppe 4, allenfalls leicht erniedrigt ist. Demgegenüber scheint die Frequenz höherer Werte der proteinnormierten IL-12 Differenzen durch Grafik 11 und den Kenngrößen in Tabelle 16 bestätigt zu werden, allerdings weitab des 5%-Signifikanzniveaus (p-Wert= 0,225) (Tabelle 19).

Tabelle 19 Vergleich der proteinnormierten Konzentrationsunterschiede zwischen Vagina und Mund für die Gruppen 1 und 4

	Gruppe 1 (n=)	Gruppe 4 (n=)	p-Wert
IL-4DP	31	73	0,779
IL-10DP	30	71	0,048
IL-12DP	31	73	0,225

Somit steht fest, dass der in der Hauptauswertung (3.3.3.) für IL-4 gefundene Befund unter Proteinnormierung nicht bestätigt werden kann.

Allerdings zeigte IL-10 eine signifikante proteinnormierte Konzentrationsdifferenz zwischen Mundraum und Vagina.

Bestärkt wurde aber auch unter Proteinnormierung, die schon in 3.3.3. gefundene Tendenz für IL-12, eine Differenz zwischen Mundraum und Vagina offenzulegen. Die Signifikanz ist allerdings mit einem p-Wert von 0,225 (Tabelle 19) weit vom 5%- Signifikanzniveau entfernt.

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie untersuchten wir 33 Patientinnen mit oralem und simultanem vaginalen Pilzbefall, 8 Patientinnen mit ausschließlich oralem Pilzbefall, 25 Patientinnen, die alleinigen vaginalen Pilzbefall aufwiesen und eine Kontrollgruppe aus 76 Patientinnen, bei denen weder oraler noch vaginaler Pilzbefall nachzuweisen war. Die Patientinnenproben aus Speichel und Vaginal Lavage wurden von uns mittels kultureller Anzucht in Sabouraud Agar Flüssigkulturröhrchen, Lichtmikroskopie, Ausstrich auf Chrom-Agar-Platten und Polymerasekettenreaktion (PCR) auf eine mögliche *Candida* spp. Infektion untersucht. In jeder dieser Proben bestimmten wir die Konzentrationen der Zytokine IL-4, IL-10 und IL-12 mit dem Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA).

Ziel dieser Studie war herauszufinden, ob sich in einem Vergleich der oben genannten Interleukine Unterschiede in der Immunreaktion von Vagina und Mundraum bezüglich einer *Candida* spp.- Infektion ableiten lassen.

Mittels der kulturellen Anzucht auf Chrom-Agar Platten konnten wir in den Vaginalproben *C. albicans* (18,2%), *C. glabrata* (3,6%), die Kombination *C. albicans* & *C. glabrata* (1,5%), *C. kefyr* (0,7%) und *C. krusei* (0,7%) nachweisen (Tabelle 8). In den Mundproben fanden wir auf diesem Weg *C. albicans* (19,6%), *C. glabrata* (5,8%), die Kombination *C. albicans* & *C. glabrata* (2,9%), *C. kefyr* (0,7%) und *C. krusei* (0,7%) (Tabelle 9).

Ein Vergleich der beiden anatomischen Bereiche Vagina und Mundraum zeigte in unserer Untersuchung durch kulturelle Anzucht, ein im Verhältnis etwa gleich häufiges Auftreten der unterschiedlichen *Candida* spezie.

In einem oralen *Candida*-Kulturnachweis konnten Zaremba et al. [107] unser Ergebnis nur für *C. krusei* (1%) bestätigen. Dagegen wiesen sie in 53% der Mundproben *C. albicans* und in 2% *C. glabrata* nach. Diese unterschiedlichen Ergebnisse stehen vermutlich mit dem höheren Alter der Patienten (35-92) und

der Verwendung eines anderen Nachweismediums (API 20C AUX, bioMerieux) in Zusammenhang.

Dass unterschiedliche Kultur-Nachweismedien eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber den einzelnen *Candida* spezieies besitzen, wiesen Guzel et al. [35] in ihrer Untersuchung nach. So zeigte ChromID *Candida* agar bei monofungalen Infektionen und polyfungalen Infektionen mit 96,6% eine höhere Sensitivität, als der von uns verwendete CHROMagar *Candida* (monofungale Infektionen: 95,1%, polyfungale Infektionen: 86,2%). Da sich nach 24-stündiger Inkubation auch die *C. albicans* Identifikation deutlich einfacher gestaltete (ChromID *Candida* agar: 64,4%, CHROMagar *Candida*:25,4%), wäre, der Studie zufolge, für zukünftige Untersuchungen zu überlegen, das Kulturmedium ChromID *Candida* agar zu verwenden.

Allerdings, weitgehend übereinstimmend mit unseren Ergebnissen, fanden die Autoren in einem vaginalen *Candida*-Kulturnachweis *C. albicans* (24,9%), *C. albicans* & *C. glabrata* (5,3%), *C. kefyr* (2,3%) und *C. krusei* (1,9%). Interessanterweise konnten sie aber *C. glabrata* in 17,3% der Proben nachweisen.

Eine Erklärung hierfür ließe sich in dem erhöhten Anteil an Patientinnen mit akuter VVC (25,7%) vermuten, die in unserer Studie anamnestisch ausschließlich 10% der Patientinnen aufwiesen.

Gegen diese Erklärung spricht allerdings die Untersuchung von Linhares et al. [50], die bei an Vulvovaginitis leidenden Patientinnen den Anteil von *C. albicans* mit 62,8% und die von *C. glabrata* lediglich mit 3,3% angaben.

Laut diesen Autoren gibt es allerdings eine Vielzahl von Faktoren, die einen positiven Kulturnachweis beeinflussen, wie beispielsweise die Einnahme oraler Kontrazeptiva und Antibiotika, vaginales Erythem und Schwangerschaft.

Das Vorhandensein unterschiedlicher Einflüsse, lässt auch die Studie von Ahmad et al. [2] vermuten, die im Gegensatz zu Linhares et al. bei Patientinnen mit vulvovaginalen Symptomen den Anteil von *C. albicans* mit 46,9% und von *C. glabrata* mit 36,7% angaben.

So fand die Studiengruppe von Babic et al. [4] in den Vaginalproben von Schwangeren 40,9% *C. albicans* und 4,2% *C. glabrata*, bei nicht Schwangeren hingegen 23% *C. albicans* und 3,2% *C. glabrata*. Ein Ergebnis, das in Einklang mit unserer Studie steht, beachtet man, dass lediglich 8% unserer Patientinnen schwanger waren (Tabelle 6).

Dass eine Schwangerschaft das Auftreten eines positiven Candida-Kulturnachweises signifikant beeinflusst, konnten Ahmad et al. [2] nachweisen. Für die Auswirkung einer Antibiotika- und Kontrazeptivaeinnahme auf einen positiven Kultur-Befund konnten die Autoren ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang belegen.

Ebenso konnten Pirotta et al. [71] nachweisen, dass eine Antibiotikaeinnahme zu einer erhöhten vaginalen Candida spp.-Belastung führt. So stieg bei ihren Patientinnen nach Antibiotikagebrauch der Candida spp.-Nachweis von 21% auf 37%. Der von den Autoren ermittelte *C. albicans*- (15,33%) und *C. glabrata*- (4,2%) Anteil vor der Antibiotikaeinnahme kann dabei die Erkenntnisse unserer Studie bestätigen (Tabelle 8).

Zusammenfassend lässt sich aus den obengenannten Studien ableiten, dass nicht nur unterschiedliche Candida-Kulturmedien, sondern auch mehrere Patientinnen-bezogene Faktoren den Kulturnachweis entscheidend beeinflussen. Dies könnte die Varianz der Untersuchungsergebnisse erklären.

In einem weiteren Schritt untersuchten wir die Mund- und Vaginalproben auf die Zytokin-Konzentrationen von IL-4, IL-10, IL-12 und den Gesamtprotein-gehalt.

Bisher wurden, unserem Wissen nach, nur wenige Versuche an Hand von Interleukinen unternommen, die beiden unterschiedlichen anatomischen Bereiche Vagina und Mund aufgrund einer Candidabesiedelung einem immunologischen Vergleich zu unterziehen. Ein großer Teil der bisherigen Studien bezieht ihre Erkenntnisse lediglich aus Tierversuchsstudien und in vitro Gewebsmodellen.

So entwickelte die Studiengruppe um Schaller et al. [89,90] an Hand organotypischer oraler und vaginaler Gewebe ein in vitro Modell oraler und vaginaler Candidiasis. Laut ihrer Aussage lassen sich aus der Versuchsanordnung mittels histologischer und biochemischer Analysen Erkenntnisse über die Immunantwort, Protein- und Genexpression und die Epithelzellinteraktionen gewinnen. Einen Vorteil sehen die Autoren in der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und dem Ausschluss aller nichtepithelialen Faktoren. Dies lässt allerdings die Frage aufkommen, inwieweit sich solche Aussagen mit der realen Immunreaktion in Mund und Vagina in vivo decken und welchen Wert die Aussagen letztlich besitzen.

Naglik et al. [61,62] unternahmen den Versuch, eine orale und vaginale Candidainfektion an Hand bestimmter immunologischer Parameter zu vergleichen. Im Gegensatz zu unserer Studie untersuchten sie allerdings keine Interleukine, sondern die Genexpression sekretorischer Aspartat Proteinasen (SAP) und der Phospholipase B (PLB). Sie fanden heraus, dass eine orale Candidainfektion mit einer SAP1-, SAP3-, SAP4-, SAP7-, SAP8- und PLB1-Expression vergesellschaftet war, wohingegen eine SAP1-, SAP3-, SAP6-, SAP7- und SAP8-Expression vor allem mit einer vaginalen Candidainfektion in Zusammenhang stand. SAP1, SAP3 und SAP8 sollen dabei vor allem bei der vaginalen Candidiasis aufgetreten sein. Dies stellt hinsichtlich unserer Studie ein interessantes Ergebnis dar, da auch wir Hinweise für ein unterschiedliches Expressionsverhalten von oralen und vaginalen Immunparametern (Interleukinen) bezüglich einer Candidiasis fanden.

Inwieweit Mund und Vagina unterschiedlich auf eine Candidainfektion reagieren, untersuchten auch Rahman et al. [74]. In ihrem Tierversuch an Mäusen konnten die Autoren nachweisen, dass lediglich drei Candida Stränge zu einer oralen und vaginalen Kolonisation führten, wohingegen aber nur jeweils ein bestimmter Strang zu einer Kolonisation der gesamten Mäusepopulation und ein Strang zu einer andauernden vaginalen Kolonisation führte. Somit weist auch

dieses Ergebnis auf ein unterschiedliches immunologisches Verhalten der beiden anatomischen Bereiche Vagina und Mundraum bezüglich einer Candidiasis hin. Kritisch angemerkt sei allerdings, dass sich die Autoren hauptsächlich auf das Kolonisationsverhalten der *Candida* spp. und nicht auf das Auftreten von Immunparametern bezogen.

Ein weiterer Autor, der in seinen Untersuchungen die immunologische Reaktion der oralen und vaginalen Candidiasis verglich, ist Fidel [25,26]. Er versucht in einer Zusammenschau verschiedener Studien die unterschiedlichen Mechanismen der Immunabwehr einer oralen und vaginalen Candidainfektion aufzuzeigen. Seine Studien basieren auf Tierversuchsmodellen, auf Patientinnen mit recurrenter vulvovaginal Candidose (RVVC) und auf HIV- infizierten Patienten. Der Autor kommt zu dem Schluss, dass für die Abwehr einer oropharyngealen Candidiasis (OPC) vor allem die lokale und systemische zellvermittelte Immunität eine wichtige Rolle spielen, wohingegen er bezüglich der vulvovaginal Candidose (VVC) für beide Formen der Immunreaktion nur wenige Hinweise findet. Auch der angeborenen Immunität misst er nur einen geringen Einfluss auf die vaginale Candidaabwehr bei, während er die Rolle der humoralen Immunität als gänzlich ungeklärt bewertet. Allerdings fand der Autor einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der OPC und der im Blut reduzierten CD4+-Zellen. Er erklärt dies mit der Notwendigkeit einer gewissen Anzahl an systemischen CD4+-Zellen und einer vorhandenen lokalen Immunität, um die orale Mukosa vor einer Infektion schützen zu können. Ebenso sieht er es als erwiesen an, dass Epithelzellen in Speichel und Vaginal Lavage das *Candida* Wachstum in vitro hemmen können.

In unserer Studie stellten wir uns die Frage, ob sich über die Konzentrationen der Interleukine IL-4, IL-10 und IL-12 bei einer *Candida* spp.- Infektion Unterschiede in der oralen und vaginalen Immunreaktion finden lassen.

Unsere Auswertung der Mund- und Vaginalproben mittels ELISA ergab für das Patientinnenkollektiv einen signifikant erhöhten Gesamtproteingehalt ($p < 0,001$)

in der Vagina. Diese Tatsache lässt sich folgendermaßen erklären: Thomas et al. [99] bestimmten den Gesamtproteingehalt im Speichel und gaben eine Spanne von 1,1-6,4 g/l an. Für die Proteingehaltsbestimmung der Vaginalflüssigkeit sind keine vergleichbaren Untersuchungen bekannt. Allerdings bestimmten Tang et al. [98] 147 verschiedene Proteine in der zervikalen Vaginalflüssigkeit. Da fast die Hälfte dieser Proteine (69/147) Plasmaproteine waren, unabhängig von einer vorliegenden Candidiasis, bezeichneten die Autoren die Vaginalflüssigkeit als Plasma-Transudat. Der Gesamtproteingehalt im Serum von 66-87 g/l bestätigt so gesehen den von uns bestimmten höheren Proteingehalt der Vaginalproben gegenüber den Mundproben.

Der Vergleich der intraindividuellen Unterschiede aller Patientinnen ohne Gruppenaufteilung bezüglich einer oralen und vaginalen Candidainfektion ergab in unserer Untersuchung signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-4 ($p < 0,001$) und IL-12 ($p < 0,001$) in den Vaginalproben. Dagegen ließ sich für IL-10 ($p < 0,510$) kein signifikanter Unterschied feststellen (Tabelle 10). Ein im Vergleich zum Mundraum erhöhter *Candida* spp.-Kulturnachweis in der Vagina könnte eine Erklärung für den vermehrten Nachweis von IL-4 und IL-12 in den Vaginalproben sein.

Um diese Tatsache statistisch genauer zu untersuchen, verglichen wir die einzelnen Gruppen untereinander. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass sowohl Mundhöhle als auch Vagina von einem mehrschichtigen unverhornten Plattenepithel ausgekleidet werden [30,31,60]. Auf Grund dieser mikroskopisch anatomischen Vergleichbarkeit, sollten makroskopisch anatomische und physiologische Unterschiede nicht außer Acht gelassen werden. So produzieren in der Mundhöhle Speicheldrüsen täglich 1-1,5 l Speichel, der u. a. Enzyme wie Amylase und Lysozym, Lymphozyten und Immunglobuline enthält. In der Vagina entsteht ein natürlicher Infektionsschutz durch einen pH-Wert von 4-5, hervorgerufen durch den Glykogenabbau der Döderlein'schen Bakterien zu Milchsäure [30,31,60]. Inwieweit diese Faktoren die Immun-

antwort von Mundhöhle und Vagina bezüglich Interleukinen beeinflussen, könnte unserer Meinung nach Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

In einem Vergleich von Patientinnengruppe 2 (vaginal Candida negativ/ oral Candida positiv) mit Gruppe 3 (vaginal Candida positiv/ oral Candida negativ) fanden wir für IL-4 (p-Wert=0,179) durchaus einen Hinweis für eine unterschiedliche Immunreaktion von Mundraum und Vagina, wenn auch abseits des Signifikanzniveaus von 0,050. Auch IL-12 (p-Wert=0,147) lässt in einem Vergleich von Kontrollgruppe 4 (vaginal Candida negativ/ oral Candida negativ) mit Gruppe 1 (vaginal Candida positiv/ oral Candida negativ) ein unterschiedliches immunologisches Verhalten von Mundraum und Vagina vermuten. Allerdings liegt auch hier der p – Wert vom Signifikanzniveau 0,050 entfernt.

Unter Normierung auf den Gesamtproteingehalt fanden wir durch den Vergleich von Gruppe 1 (vaginal Candida positiv/ oral Candida negativ) mit Gruppe 4 (vaginal Candida negativ/ oral Candida negativ) sowohl für IL-10 (p-Wert= 0,048) als auch für IL-12 (p-Wert=0,225) Ergebnisse, die auf eine unterschiedliche Immunreaktion aufgrund einer Candidainfektion schließen lassen. Lediglich für IL-10 ist dieses Ergebnis allerdings auch signifikant (p-Wert=0,048).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich für IL-12 als einzigem Interleukin, mit und ohne Normierung auf den Gesamtproteingehalt, ein Anhalt für eine unterschiedliche Immunreaktion von Mund und Vagina ergibt. Das einzig signifikante Ergebnis findet sich allerdings für IL-10 unter Proteinnormierung. Welche Aussagen die von uns untersuchten Interleukine 4, 10 und 12 bezüglich der Candidiasis zulassen, soll im Folgenden erörtert werden.

Die Auswirkung einer oralen Candidiasis auf die Ausschüttung der Interleukine IL-4, IL-10 und IL-12 ist bislang Gegenstand einiger Studien gewesen.

So fanden Sosroseno et al. [96] in einer Studie heraus, dass hohe Konzentrationen von IL-12, nicht aber von IL-4 und IL-10, die Ausprägung einer oralen Candidiasis reduzieren können. Demgegenüber stehen die Erkenntnisse von Elahi et al. [17], die in einem Tierversuch mit Mäusen nachwiesen, dass ein

früher Konzentrationsanstieg von IL-4, IL-12 und IFN-gamma mit einer schnellen oralen *Candida albicans*-Eliminierung einherging. Eine Neutralisation von IL-4 führte zu einer erhöhten oralen Candidabesiedelung und einer geringeren *Candida*-Eliminierung. Aus einer weiteren Studie leiteten Elahi et al. [15] ab, dass IL-4 mit einer Widerstandsfähigkeit gegen orale Candidiasis in Zusammenhang steht. 2003 kamen Elahi et al. [16] zu dem Schluß, dass IL-4 und IFN-gamma zu einer oralen Eliminierung von *Candida albicans* beitragen, wobei IL-4 über eine Erhöhung der NO-Produktion wirkt. Kritisch sollte bezüglich der Studien von Elahi et al. angemerkt werden, dass diese im Widerspruch zu den Erkenntnissen aller übrigen Studien stehen.

Denn auch Leigh et al. [47] fanden, im Gegensatz zu Elahi et al., heraus, dass an oropharyngealer Candidiasis (OPC) erkrankte Patienten eine höhere Ausschüttung von Th2-Zytokinen (IL-4 und IL-10), aufwiesen als eine Kontrollgruppe. 2004 kam eine Studiengruppe von Schaller et al. [88] zu dem Ergebnis, dass durch die Anwesenheit polymorphkerniger Leukozyten die Th1-Immunantwort während einer oralen Candidiasis verstärkt wird und gleichzeitig die Expression von IL-10 verringert wird. Dies führte nach Meinung der Autoren zu einer erhöhten oralen Immunabwehr gegen *Candida albicans*. In einer weiteren Studie konnten Farah et al. [21] an spezifischen Zytokin-Knockout-Mäusen nachweisen, dass IL-12p40 für die Ausheilung der oralen Candidiasis unverzichtbar ist.

Aus den Erkenntnissen der genannten Studien, mit Ausnahme der Studien von Elahi et al. , lässt sich ableiten, dass das Vorhandensein von Th1-Zytokinen wie IL-12 mit der Bekämpfung der oralen Candidiasis zusammenhängt. Die Expression von Th2-Zytokinen wie IL-4 und IL-10 hingegen ist für die Anfälligkeit für eine Candidiasis von Bedeutung. Betrachtet man im Folgenden Studien zur Immunreaktion der vaginalen Candidiasis bezüglich der Interleukine IL-4, IL-10 und IL-12, so ergibt sich ein ähnliches Bild.

1993 kamen Fidel et al. [27] in einer Versuchsstudie mit Mäusen zu dem Ergebnis, dass Mäuse mit vaginaler Candidiasis erhöhte Konzentrationen von IL-2 und IFN-gamma produzierten, keine IL-10 Produktion und lediglich geringe Anstiege von IL-4 aufwiesen. Ihrer Meinung nach entwickelten die Mäuse hauptsächlich eine Th1-Typ Candida – spezifische periphere CMI Reaktivität, die unabhängig von der Infektionsdauer und dem Östrogenstatus ist.

Bestätigen konnten dies, in einer Patientinnenstudie, Fidel et al. [28] die einen Anstieg von Th1-Typ Zytokinen (IL-2, IL-12, INF-gamma) und Histamin, nach Einbringung von Candida-Test-Antigenen in die Vagina, beobachten ließ.

Weissenbacher et al. [104] konnten ein verstärktes Auftreten von IL-10 und IL-12 bei Patientinnen mit RVVC nachweisen. Die Ausschüttung von IL-12 brachten sie dabei mit einer Anregung, die Ausschüttung von IL-10 hingegen mit einer Unterdrückung der Vaginal-Zellvermittelten Immunität und einer möglichen allergischen Ursache in Zusammenhang. 2004 veröffentlichten Weissenbacher et al. [103] eine Studie, die sich mit Patientinnen mit chronischer RVVC befasste. Sie untersuchten die Patientinnen auf IL-4, IL-5, IL-13, Prostaglandin E2, IgE und Candida-spezifisches IgE und konnten bei IL-4, Prostaglandin E2 und Candida IgE einen signifikanten Anstieg nachweisen. Weissenbacher et al. sehen in dem Ergebnis einen Hinweis auf eine allergische Komponente der chronischen RVVC.

In einer Tierversuchsstudie an Mäusen kamen Ouyang W et al. [68] zu dem Schluss, dass zu einem frühen Zeitpunkt der Candidainfektion hohe Konzentrationen des Th1-Zytokins IL-2 zu einer Ausheilung der Candidiasis führen und dass es zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Infektion durch das Th2-Zytokin IL-10 zu einer Anfälligkeit für eine Candidiasis kommt.

Zusammengenommen weisen daher diese Studien daraufhin, dass bezüglich einer vaginalen Candidiasis die Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 zu einer Anfälligkeit beziehungsweise Immununterdrückung führen, IL-12 hingegen eine erhöhte Abwehrbereitschaft gegen eine Candidainfektion gewährleistet. Diese Ergeb-

nisse können somit in Übereinstimmung mit den Erkenntnissen zur oralen Immunantwort durch IL-4, IL-10 und IL-12 gesehen werden. Einige weitere Erkenntnisse zur Expression der genannten Interleukine beziehen sich nicht auf Mundraum oder Vagina, sondern leiten sich aus Untersuchungen zu der systemischen und disseminierten Candidiasis ab.

Romani et al. [81] untersuchten mit systemischer Candidiasis infizierte Mäuse, bei denen sie eine Neutralisation von IL-4 vornahmen. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Produktion von IL-4 durch Th2-Zellen die Th-1 vermittelte schützende Immunität der Mäuse einschränkt. Bestätigen konnten diese Erkenntnisse Puccetti et al. [72]. Ihrer Aussage nach führte die Entfernung von zirkulierendem IL-4 zu einer Ausheilung der Candidiasis bei über 90% der Mäuseindividuen und zu einer Verstärkung der Th1-vermittelten Candidaabwehr.

1994 kamen Romani et al. [83], ebenfalls durch Tierversuche mit Mäusen, zu folgenden Ergebnissen: IL-12p40 wurde hauptsächlich in Makrophagen solcher Mäuse nachgewiesen, die erfolgreich eine systemische Candidiasis bekämpften. IL-4 und IL-10 produzierende CD4+-Zellen traten vermehrt, unter Einfluss von IFN-gamma, in Mäusen auf, die der Candidiasis erlagen. Die Autoren schätzten die Mitwirkung von IL-12 an der Th1-Immunantwort höher ein, als die des IFN-gamma. Romani et al. [82] wollten in einer weiteren Studie die Rolle von IL-12 bei der systemischen Candidiasis von Mäusen genauer bestimmen. IL-12 wird vor allem in solchen Mäusen nachgewiesen, die die Candidiasis erfolgreich bekämpfen und wird in vitro für die Entwicklung der Th1-Immunität benötigt, so die Autoren. Sie kommen zu dem Schluss, dass exogenes IL-12 bei einer starken IL-4/ IL-10 Immunantwort nicht für eine Umwandlung in eine Th1-Antwort ausreicht, endogenes IL-12 hingegen für eine Ausbildung der Th1-Antwort in vivo notwendig ist.

Tonetti et al. [100] untersuchten die Auswirkung von exogenem IL-4 und IL-10 bei Mäusen mit systemischer oder gastrointestinaler Candidiasis. Die Autoren fanden heraus, dass die Wirkung von IL-4 und IL-10 die Candidiasis deutlich

verschlechterte, die IL-12-Produktion unterdrückte und zu einer Dominanz der Th2-Zellen führte, hingegen keinen Einfluss auf eine starke Th1-Immunität hatte.

1997 initiierten Roilides et al. [77] eine Studie, um die Auswirkung von IL-4 auf humane mononukleare Phagozyten gegen *Candida albicans* zu analysieren. Ihre Ergebnisse deuten daraufhin, dass IL-4 bei einer invasiven Candidiasis die Aufnahme und Abtötung von *Candida*-Blastoconidien durch morphonukleare Leukozyten unterdrückt.

Mencacci et al. [58] fassten zusammen, dass endogenes IL-4 möglicherweise aufgrund seiner Einwirkung auf Zellen der angeborenen und erworbenen Immunität für den Aufbau der schützenden Th1-Zell-Immunantwort benötigt wird. In einer weiteren Zusammenfassung von Studienergebnissen kamen Mencacci et al. [57] zu dem Schluss, dass IL-12 obligatorisch für die Entwicklung einer Anti-*Candida* Th1-Immunantwort ist. Des Weiteren fanden die Autoren heraus, dass eine positive Verstärkung zwischen IL-12 und IL-10 besteht, welche die angeborene Immunabwehr gegen *Candida* beeinträchtigt, andererseits aber für eine Aktivierung von IL-12-abhängigen Th1-Zellen benötigt wird.

Lavigne et al. [45] führten eine Studie an Mäusen mit Candidiasis durch. Nachdem die Autoren den Tieren IL-12 zugeführt hatten, zeigten die Mäuse eine charakteristische Th1-Zytokin-Immunantwort, wobei nur wenig bis kein IL-4, hingegen erhöhte IFN-gamma Konzentrationen nachgewiesen werden konnten.

Del Sero et al. [13] untersuchten an Mäusen die Auswirkung von IL-10 auf eine dissimierte und gastrointestinale Candidiasis. Hierbei kamen sie zu folgenden Ergebnissen: Die gesteigerte Widerstandsfähigkeit gegen eine Candidainfektion hängt mit einer verstärkten angeborenen und erworbenen Th1-Immunantwort und mit einer deutlich erhöhten Produktion von IL-12, NO, TNF-alpha und IFN-gamma zusammen. In Abwesenheit von IL-10 zeigt sich eine gesteigerte angeborene und erworbene Immunität durch die Erhöhung von Th1-Zytokin-Konzentrationen und somit eine schnelle Reduzierung des Pilzwachstums.

Der Vollständigkeit halber sei noch auf die Studie eines in unseren Augen interessanten Einzelfalles hingewiesen. Lighter et al. [49] dokumentierten den Fall eines HIV-positiven Kindes mit einer Candidasepsis, metabolischer Azidose und T-Zell-Lymphom. Im Serum konnten signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-10 nachgewiesen werden. Diese Tatsache bringen die Autoren mit dem akuten Krankheitsverlauf in Zusammenhang.

Insgesamt weisen also unabhängig von der anatomischen Lokalität die Th2-Interleukine IL-4 und IL-10 auf eine Candidiasisanfälligkeit und Verschlechterung des Krankheitsverlaufes, das Th1-Interleukin IL-12 hingegen auf eine Bekämpfung der Candidiasis hin. Diese Erkenntnisse können aus unserer Sicht eine therapeutische Bedeutung besitzen.

Die Behandlung der oralen Candidiasis besteht immer noch in einer adäquaten Mundhygiene, der Verwendung lokaler Antimykotika wie den Polyenen Nystatin und Amphotericin B, der Imidazole wie Miconazol, Clotrimazol und Ketoconazol und in komplizierten Fällen in der systemischen Gabe von Triazolen wie Fluconazol oder Itraconazol bzw. einem DNA-Analogon wie 5-Fluorocytosin [3,39]. Zur Behandlung der RVVC oder VVC gilt weiterhin bei *C. albicans*-Nachweis die orale Gabe von Azolen wie Ketoconazol, Itraconazol oder Fluconazol, sowie die vaginale Gabe von Clotrimazol, bei *C. tropicalis* oder *C. glabrata* kommt vaginal vor allem Terconazol zur Anwendung [91].

Aufgrund unserer Ergebnisse wäre, aus therapeutischer Sicht, ebenfalls ein neues Vorgehen bei der Behandlung oraler und vaginaler Candidiasis sinnvoll. Für eine Candidiasistherapie wäre theoretisch sowohl oral als auch vaginal die Gabe von Interleukinantagonisten oder die exogene Zufuhr von Interleukinen denkbar. Da unseres Wissens nach die Datenbasis hierfür noch sehr gering ist, sollte die Funktion der Interleukine bezüglich oraler und vaginaler Candidiasis zukünftig noch intensiver Gegenstand weiterer Studien sein. Damit könnte ein neuer Weg in der Therapie oraler und vaginaler Candidainfektionen beschritten werden.

5. Zusammenfassung

Die zwei häufigsten Formen opportunistischer Pilzinfektionen am Menschen, stellen die oropharyngeale (OPC) und die vulvovaginale (VVC) Candidiasis dar. Ziel der vorliegenden Studie war es, in einem Vergleich der Zytokin-konzentrationen von IL-4, IL-10 und IL-12, eventuelle Unterschiede in der Immunreaktion von Vagina und Mundraum aufgrund einer Candida spp. Infektion zu finden. Dafür untersuchten wir im Rahmen der mikrobiologischen Spezialprechstunde des Klinikums Großhadern der LMU München, 33 Patientinnen mit oralem und simultanem vaginalen Candida spp.-Befall, 8 Patientinnen mit oralem Candida-Befall, 25 Patientinnen mit nur vaginalem Candida-Befall und eine asymptotische Kontrollgruppe aus 76 Candidanegativen Patientinnen. Zusätzlich haben wir mit einem Fragebogen eine Anamnese erhoben.

Die vaginalen und oralen Proben wurden von uns mittels kultureller Anzucht in Sabouraud Agar Flüssigkulturröhrchen, Lichtmikroskopie, Ausstrich auf Chrom-Agar Platten und PCR, auf möglichen Pilzbefall untersucht. Anschließend bestimmten wir in allen Proben die Konzentrationen der Zytokine IL-4, IL-10, IL-12 und des Gesamtproteins.

Für die statistische Auswertung verwendeten wir den gepaarten Wilcoxon-Test und den Kruskal-Wallis-Test.

Im Ergebnis fanden wir signifikant erhöhte Konzentrationen ($p < 0,001$) von IL-4, IL-12 und dem Gesamtprotein in den Vaginalproben. Für IL-10 ergab sich ein p-Wert von $p < 0,510$.

Im Vergleich der Patientinnengruppe 2 (vaginal Candida negativ/ oral Candida positiv) mit Gruppe 3 (vaginal Candida positiv/ oral Candida negativ), fanden wir für IL-4 (p-Wert = 0,179) durchaus einen Hinweis auf eine unterschiedliche Reaktion von Mundraum und Vagina, allerdings abseits des Signifikanzniveaus von 0,050. Auch IL-12 (p-Wert = 0,147) lässt in einem Vergleich der Kontroll-

gruppe 4 (vaginal Candida negativ/ oral Candida negativ) mit Gruppe 1 (vaginal Candida positiv/ oral Candida negativ) ein unterschiedliches Verhalten von Mundraum und Vagina vermuten. Der p-Wert liegt aber entfernt des Signifikanzniveaus von 0,050.

Durch Normierung auf den Gesamtproteingehalt fanden wir im Vergleich der Gruppe 1 (vaginal Candida positiv/ oral Candida negativ) mit Gruppe 4 (vaginal Candida negativ/ oral Candida negativ), sowohl für IL-10 (p-Wert = 0,048), als auch für IL-12 (p-Wert = 0,225) Ergebnisse, die auf eine unterschiedliche Immunreaktion bezüglich einer Candidainfektion schließen lassen. In unserer Studie lieferte also nur IL-10, unter Normierung auf den Gesamtproteingehalt, ein statistisch signifikantes Ergebnis (p-Wert = 0,048) für eine unterschiedliche lokale Immunantwort zwischen Mundraum und Vagina. Für IL-12 lässt sich diese Aussage, mit und ohne Normierung auf den Gesamtproteingehalt, außerhalb des Signifikanzbereiches zumindest vermuten.

Wie in einer Vielzahl von Untersuchungen bestätigt, weisen die antiinflammatorischen Th2-Typ Interleukine IL-4 und IL-10 auf eine Hemmung der lokalen Immunantwort und Anfälligkeit bezüglich einer Candidiasis hin. Proinflammatorische Th1-Typ Interleukine wie IL-12, stehen für eine erhöhte lokale Widerstandsfähigkeit und Bekämpfung der Candidiasis.

Über die Gabe von Interleukin-Antagonisten und exogene Zufuhr von Interleukinen könnte, durch Beeinflussung der lokalen Immunität, ein neuer Weg in der Behandlung der oralen und vaginalen Candidiasis beschritten werden. Hierzu sind zukünftig noch weitere Studien notwendig, die Unterschiede in der oralen und vaginalen Immunreaktion, durch unterschiedliche Interleukin-expression, untersuchen und offen legen.

6 Literaturverzeichnis

1. Abu-Elteen KH, Abu-Elteen RM. The prevalence of candida albicans populations in the mouths of complete denture wearers. New Microbiol 1998;21:41-48
2. Ahmad A, Khan AU. Prevalence of Candida species and potential risk factors for vulvovaginal candidiasis in Aligarh, India. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2009;144:68-71
3. Akpan A, Morgan R. Oral Candidiasis. Postgrad Med J 2002;78:455-459
4. Babic M, Hukic M. Candida albicans and non-albicans species as etiological agent of vaginitis in pregnant and non-pregnant women. Bosn J Basic Med Sci 2010;10:89-97
5. Barousse MM. Growth inhibition of Candida albicans by human vaginal epithelial cells. J Infect Dis 2001;184:1489-1493
6. Beladi I, Nasz I. Orvosi Mikrobiologia. Semmelweis Kiado 295;1993
7. Bennett JE. Antimicrobial agents, antifungal agents. In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS, editors. Goodman and Gilman`s the pharmacological basis of therapeutics. 8th Ed. New York: Pergamon Press;1990:1165-1181
8. Candida albicans. Verfügbar unter:
[URL:http://dr.miller.com/Bilder/Candida.jpg](http://dr.miller.com/Bilder/Candida.jpg)
9. Candida albicans Kultur. Verfügbar unter:
[URL:http://phil.cdc.gov/phil_images/20030219/4/Phil_3192_lores.jpg](http://phil.cdc.gov/phil_images/20030219/4/Phil_3192_lores.jpg)
10. Calderone RA. Candida and Candidiasis. Washington DC;2002
11. Channoum MA, Burns GR, Elteen A. Experimental evidence for the role of lipids in adherence of candida spp. to human buccal epithelial cells. Infect Immun 1986;54:189

12. D'Andrea A, Ma X, Aste-Amegaza M, Paganin C, Trinchieri G. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* 1995;181:537-546
13. Del Sero G, Mencacci A, Cenci E, Fe d'Ostiani C, Montagnoli C, Bacci A, Mosci P, Kopf M, Romani L. Antifungal type 1 responses are upregulated in IL-10-deficient mice. *Microbes and Infection* 1999;1:1169-1180
14. Denning DW. Fortnightly review: Management of genital candidiasis. *BMJ* 1995;310:1241-1244
15. Elahi S, Pang G, Ashman RB, Clancy R. Nitric oxide-enhanced resistance to oral candidiasis. *Immunology* 2001;104:447-454
16. Elahi S, Pang G, Clancy R. Development of surrogate markers for oral immunisation against *Candida albicans*. *Vaccine* 2003;21:671-677
17. Elahi S, Pang G, Clancy R, Ashman RB. Cellular and cytokine correlates of mucosal protection in murine model of oral candidiasis. *Infect Immun* 2000;68:5771-5777
18. ELISA-Platte. Verfügbar unter:
URL:http://www.ttzbremerhaven.de/Mycoplex2_presse.jpg
19. Empfehlung des Robert Koch-Instituts: Pathogenetische Bedeutung der intestinalen Candidabesiedelung. 2004. Verfügbar unter: URL:
http://www.apug.de/archiv/pdf/bgbl_methkom_candida.pdf
20. Epstein JB. Antifungal therapy in oropharyngeal mycotic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990;69:32-41
21. Farah CS, Hu Y, Riminton S, Ashman RB. Distinct roles for interleukin-12p40 and tumour necrosis factor in resistance to oral candidiasis defined by gene-targeting. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:252-255
22. Fidel PL Jr. Immunity in vaginal candidiasis. *Curr Opin Infect Dis* 2005;18:107-111

23. Fidel PL Jr. History and new insights into host defense against vaginal candidiasis. *Trends Microbiol* 2004;12:220-227
24. Fidel PL Jr. The protective immune response against vaginal candidiasis: lessons learned from clinical studies and animal models. *Int Rev Immunol* 2002;21:515-548
25. Fidel PL Jr. Distinct protective host defenses against oral and vaginal candidiasis. *Med Mycol* 2002;40:359-375
26. Fidel PL Jr. Immunity to *Candida*. *Oral Dis* 2002;8 Suppl 2:69-75
27. Fidel PL, Lynch ME, Sobel JD. *Candida*-specific Th1-type responsiveness in mice with experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun* 1993;61:4202-4207
28. Fidel PL, Ginsburg KA, Cutright JL, Wolf NA, Leaman D, Dunlap K, Sobel JD. Vaginal-associated immunity in women with recurrent vulvovaginal candidiasis: evidence for vaginal Th1-type responses following intravaginal challenge with *Candida* antigen. *J Infect Dis* 1997;176:728-739
29. Fraser VJ 1992, Jones M, Dunkel J. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. *Clin Infect Dis* 1992;15:414-421
30. Frick H, Leonhardt H, Starck D. *Allgemeine Anatomie, Spezielle Anatomie I*. Stuttgart New York; 1992
31. Frick H, Leonhardt H, Starck D. *Spezielle Anatomie II*. Stuttgart New York; 1992
32. Ghannoum MA, Radwan SS. *Candida* adherence to epithelial cells. Boca Raton, FL: CRC Press 1990
33. Guida RA. Candidiasis of the oropharynx and oesophagus. *Ear Nose Throat J* 1988;67:832-840
34. Gupta AK, Sauder DN, Shear NH. Antifungal Agents; an overview. Part 1. *J Am Acad Dermatol* 1994;30:677-698

35. Guzel AB, Ilkit M, Akar T, Burgut R, Demir SC. Evaluation of risk factors in patients with vulvovaginal candidiasis and the value of chromID Candida agar versus CHROMagar Candida for recovery and presumptive identification of vaginal yeast species. *Med Mycol* 2011;49:16-25
36. Haefner HK. Current evaluation and management of vulvovaginitis. *Clin Obstet Gynecol* 1999;42:184-195
37. Heine GS, Stevens DS, Greenspan D. Fluconazole-resistant candida in AIDS patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993;76:711-715
38. Hermann P, Berek Z, Krivan G, Marton K, Fejerdy P, Lengyel A. Frequency of oral candidiasis in stem cell transplant patients. *Fogorv Sz* 2006;99:9-14
39. Hermann P, Berek ZS, Nagy G, Kamotsay K, Rozgonyi F. Pathogenesis, microbiological and clinical Aspects of oral candidiasis (candidosis). *Acta Microbiol Immunol Hung* 2001;48:479-495
40. Kanbe T, Li RK, Wadsworth E. Evidence for expression of the C3d receptor of candida albicans in-vitro and in-vivo obtained by immunoflourescence and immunoelectron microscopy. *Infect Immun* 1991;59:1832
41. Kelly-Welch A, Hanson EM, Keegan AD. Interleukin-4 (IL-4) pathway. *Sci STKE* 2005;2005(293)pcm 9
42. Kiechle M. Gynäkologie und Geburtshilfe. Urban&Fischer; 1. Auflage 2007
43. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Triencheri G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989;170:827

44. Kriegel MA, Tretter T, Blank N, Schiller M, Gabler C, Winkler S, Kalden JR, Lorenz HM. Interleukin-4 supports interleukin-12-induced proliferation and interferon- γ secretion in human activated lymphoblasts and T helper type 1 cells. *Immunology* 2006;119:43-53
45. Lavigne LM, Schopf LR, Chung CL, Maylor R, Sypek JP. The role of recombinant murine IL-12 and IFN- γ in the pathogenesis of a murine systemic *Candida albicans* infection. *J Immunol* 1998;160:284-292
46. Lehmann PF. Fungal structure and morphology. *Medical Mycology* 1998;4:57-58
47. Leigh JE, Steele C, Wormley FL, Luo W, Clark RA, Gallaher W, Fidel PL. Th1/Th2 cytokine expression in saliva of HIV-positive and HIV-negative individuals: a pilot study in HIV-positive individuals with oropharyngeal candidiasis. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998;19:373-380
48. Lewis Mao, Lamey PJ. *Clinical oral medicine*. Oxford; 1995
49. Lighter J, Tse DB, Kaul A, Borkowsky W. Hyper interleukin-10 in an HIV-positive child with t-cell lymphoma and candidal sepsis. *J Int Assoc Physicians AIDS Care* 2008;7:228-231
50. Linhares LM, Witkin SS, Miranda SD, Fonseca AM, Pinotti JA, Ledger WJ. Differentiation between women with vulvovaginal symptoms who are positive or negative for *Candida* species by culture. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2001;9:221-225
51. Lumbreras C, Cuervas-Mons V, Jara P. Randomised trial of fluconazole versus nystatin for the prophylaxis of candida infection following liver transplantation. *J Infect Dis* 1996;174:583-588
52. Male D. *Immunologie auf einen Blick*. München:Jena;2005
53. Mardh PA. Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis – a review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy. *Int. J. STD AIDS* 2002;13:522-539

54. Maroof A, Penny M, Kingston R, Murray C, Islam S, Bedford PA, Knight SC. Interleukin-4 can induce interleukin-4 production in dendritic cells. *Immunology* 2006;117:271-279
55. Mencacci A, Cenci E, Bacci A, Montagnoli C, Bistoni F, Romani L. Cytokines in candidiasis and aspergillosis. *Curr Pharm Biotechnol* 2000;1:235-251
56. Mencacci A, Cenci E, Bistoni F, Del Sero G, Bacci A, Montagnoli C, Fe d'Ostiani C, Romani L. Specific and non-specific immunity to *Candida albicans*: a lesson from genetically modified animals. *Res Immunol* 1998;149:352-362
57. Mencacci A, Cenci E, Del Sero G, Fe d'Ostani C, Mosci P, Trinchieri G, Adorini L, Romani L. IL-10 is required for development of protective Th1 responses in IL-12-deficient mice upon *Candida albicans* infection. *J Immunol* 1998;161:6228-6237
58. Mencacci A, Del Sero G, Cenci E, d'Ostani CF, Bacci A, Montagnoli C, Kopf M, Romani L. Endogenous interleukin 4 is required for development of protective CD4+ T helper type 1 cell responses to *Candida albicans*. *J Exp Med* 1998;187:307-317
59. Mencacci A, Spaccapelo R, Del Sero G, Enssle KH, Cassone A, Bistoni F, Romani L. CD 4+ T-helper-cell responses in mice with low-level *Candida albicans* infection. *Infect Immun* 1996;64:4907-4914
60. Moll KJ, Moll M. *Anatomie*. Lübeck Stuttgart Jena Ulm; 1997
61. Naglik JR, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tsihlaki E, Weindl G, Tappuni AR, Rodgers CA, Woodman AJ, Challacombe SJ, Schaller M, Hube B. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology* 2008;154:3266-3280

62. Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ, Dobbie JL, Fernandes-Naglik LL, Greenspan D, Agabian N, Challacombe SJ. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *J Infect Dis* 2003;188:469-479
63. Ninane JA. Multicentre study of fluconazole versus oral polyenes in the prevention of fungal infection in children with haematological or oncological malignancies. Multicentre study group. *Eur J Clin Mikrobial Infect Dis* 1994;13:330-337
64. Nomanbhoy F. Vaginal and oral epithelial cell anti-*Candida* activity. *Infect Immun* 2002;70:7081-7088
65. Odds FC. *Candida and Candidosis*. 2nd ed. London;1988
66. Ohman SC, Jontell M. Treatment of angular cheilitis: the significance of microbial analysis, antimicrobial treatment, and interfering factors. *Acta Odontol Scand* 1988;46:267-272
67. Oropharyngeale Candidiasis. Verfügbar unter: URL:
http://www.ehow.com/about_5409980_oral-thrush-symptoms.html
68. Ouyang W, Chen S, Liu Z, Wu Y, Li J. Local Th1/Th2 cytokine expression in experimental murine vaginal candidiasis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2008;28:352-355
69. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol*;22:929-979
70. Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester GR. *Taschenatlas der Immunologie*. Stuttgart:New York; 2007
71. Pirotta MV, Garland SM. Genital *Candida* species detected in samples from women in Melbourne, Australia, before and after treatment with antibiotics. *J Clin Microbiol* 2006;44:3213-3217

72. Puccetti P, Mencacci A, Cenci E, Spaccapelo R, Mosci P, Enssle KH, Romani L, Bistoni F. Cure of murine candidiasis by recombinant soluble interleukin-4 receptor. *J infect Dis* 1994;169:1325-1331
73. Quirynen M. Management of oral malodour. *J Clin Periodontol* 2003;5:17-18
74. Rahman D, Mistry M, Thavaraj S, Challacombe SJ, Naglik JR. Murine model of concurrent oral and vaginal *Candida albicans* colonization to study epithelial host-pathogen interactions. *Microbes Infect* 2007;9:615-622
75. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of candida species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1-8
76. Ringdahl EN. Treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am Fam Physician* 2000;61:3306-3312
77. Roilides E, Kaditsoglou I, Dimitriadou A, Hatzistilianou M, Manitsa A, Karpouzas J, Pizzo PA, Walsh TJ. Interleukin-4 suppresses antifungal activity of human mononuclear phagocytes against *Candida albicans* in association with decreased uptake of blastoconidia. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997;19:169-180
78. Roilides E, Sein T, Schaufele R, Chanock SJ, Walsh TJ. Increased serum concentrations of interleukin-10 in patients with hepatosplenic candidiasis. *J Infect Dis* 1998;178:589-592
79. Romani L. Innate and adaptive immunity in *Candida albicans* infections and saprophytism. *J Leukoc Biol* 2000;68:175-179
80. Romani L. The T cell response against fungal infections. *Curr Opin Immunol* 1997;9:484-490
81. Romani L, Mencacci A, Grohmann U, Mocci S, Mosci P, Puccetti P, Bistoni F. Neutralizing antibody to interleukin 4 induces systemic protection and T helper type 1-associated immunity in murine candidiasis. *J Exp Med* 1992;176:19-25

82. Romani L, Mencacci A, Tonnetti L, Spaccapelo R, Cenci E, Puccetti P, Wolf SF, Bistoni F. IL-12 is both required and prognostic in vivo for T helper type 1 differentiation in murine candidiasis. *J Immunol* 1994;153:5167-5175
83. Romani L, Mencacci A, Tonnetti L, Spaccapelo R, Cenci E, Wolf S, Puccetti P, Bistoni F. Interleukin-12 but not interferon-gamma production correlates with induction of T helper type-1 phenotype in murine candidiasis. *Eur J Immunol* 1994;24:909-915
84. Romani L, Puccetti P, Mencacci A, Cenci E, Spaccapelo R, Tonnetti L, Grohman U, Bistoni F. Neutralization of Il-10 up-regulates nitric oxide production and protects susceptible mice from challenge with *Candida albicans*. *J Immunol* 1994;152:3514-3521
85. Romani L, Puccetti P, Bistoni F. Biological role of Th cell subsets in candidiasis. In: Romagnani S, editor. *Th1 and Th2 Cells in Health and Disease*. Farmington: CT: Karger;1996.p114
86. Ross PJ, Lavelle EC, Mills KH. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* synergizes with polysaccharide to promote innate Interleukin-10 production and enhances the induction of Th2 and regulatory T cells. *Infect Immun* 2004;72:1568-1579
87. Sarifakioglu E, Gunduz C, Gorpelioglu C. Oral mucosa manifestations in 100 pregnant versus non-pregnant patients: an epidemiological observational study. *Eur J Dermatol* 2006;16:674-676
88. Schaller M, Boeld U, Oberbauer S, Hamm G, Hube B, Korting HC. Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) induce protective Th1-type cytokine epithelial responses in an in vitro model of oral candidosis. *Microbiology* 2004;150:2807-2813
89. Schaller M, Weindl G. Models of oral and vaginal candidiasis based on in vitro reconstituted human epithelia for the study of host-pathogen interactions. *Methods Mol Biol* 2009;470:327-345

90. Schaller M, Zakikhany K, Naglik JR, Weindl G, Hube B. Models of oral and vaginal candidiasis based on in vitro reconstituted human epithelia. *Nat Protoc* 2006;1:2767-2773
91. Sheary B, Dayan L. Recurrent vulvovaginal candidiasis. *Aust Fam Physician* 2005;34:147-150
92. Sieburth D, Jabs EW, Warrington JA, Li X, Lasota J, La Forgia S, Kelleher K, Huebner K, Wasmuth JJ, Wolf SF. Assignment of genes encoding a unique cytokine (IL 12) composed of two unrelated subunits to chromosomes 3 and 5. *Genomics* 1992;14:59
93. Sobel JD. Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Infect Dis* 1992;14:148-153
94. Sobel JD, Faro S, Force RW. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178:203-211
95. Sobel JD, Muller G, Buckley HR. Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of candidal vaginitis. *Infect Immun* 1984;44:576
96. Sosroseno W, Herminajeng E, Goeno S. The interleukin network in the immunopathogenesis of oral diseases. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1994;12:161-168
97. Steele C, Fidel PL Jr. Cytokine and Chemokine Production by Human Oral and Vaginal Epithelial Cells in Response to *Candida albicans*. *Infect Immun* 2002;70:577-583
98. Tang LJ, De Seta F, Odreman F, Venge P, Piva C, Guaschino S, Garcia RC. Proteomic analysis of human cervical-vaginal fluids. *J Proteome Res* 2007;6:2874-2883
99. Thomas EL, Jefferson MM, Joyner RE, Cook GS, King CC. Leukocyte myeloperoxidase and salivary lactoperoxidase: identification and quantitation in human mixed saliva. *J Dent Res* 1994;73:544-55

100. Tonnetti L, Spaccapelo R, Cenci E, Mencacci A, Puccetti P, Coffman RL, Bistoni F, Romani L. Interleukin-4 and -10 exacerbate candidiasis in mice. *Eur J Immunol*;25:1559-1565
101. Walter MR, Cook WJ, Zhao BG, Cameron RP Jr, Ealick SE, Walter RL Jr, Reichert P, Nagabhushan TL, Trotta PP, Bugg CE. Crystal structure of recombinant human interleukin-4. *J Biol Chem* 1992;267:20371-20376
102. Weissenbacher ER, Spitzbart H. *Mykosen in der Frauenheilkunde, Diagnostik und Therapie, Fluorpraktikum II*. München: Medifact Verlag, 2001
103. Weissenbacher ER, Weissenbacher T, Spitzbart H. The significance of interleukins and of Candida-IgE in chronic recurrent vulvovaginal candidosis. *Mycoses* 2004;47:37-40
104. Weissenbacher S, Witkin SS, Tolbert V, Giraldo P, Linhares I, Haas A, Weissenbacher ER, Ledger WJ. Value of Candida polymerase chain reaction and vaginal cytokine analysis for the differential diagnosis of women with recurrent vulvovaginitis. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2000;8:244-247
105. Yoon C, Johnston SC, Tang J, Stahl M, Tobin JF, Somers WS. Charged residues dominate a unique interlocking topography in the heterodimeric cytokine interleukin-12. *EMBO J* 2000;19:3530-3541
106. Yoon SI, Logsdon NJ, Sheikh F, Donnelly RP, Walter MR. Conformational changes mediate interleukin-10 receptor 2 (IL-10R2) binding to IL-10 and assembly of the signaling complex. *J Biol Chem* 2006;281:35088-35096
107. Zaremba ML, Daniluk T, Rozkiewicz D, Cylwik-Rokicka D, Kierklo A, Tokajuk G, Dabrowska E, Pawinska M, Klimiuk A, Stokowska W, Abdelrazek S. Incidence rate of Candida species in the oral cavity of middle-aged and elderly subjects. *Adv Med Sci* 2006;51:233-236

108. Zhou T, Sun GZ, Zhang YM, Zhang YY, Zhang DQ, Tang XM, Chen N. Effect of interleukin-10 on the phenotype and function of cultured human dendritic cells. Chin Med J 2005;118:1299-1302

7 Anhang

7.1 Geräte

3 ml – Einmalspritzen		B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Brutschrank, Typ 2770		Fa. Köttermann
Pipetten, Pipetman	20 µl	Fa. Gilson
Pipetman	1000 µl	Fa. Gilson
Research	20 – 200 µl	Fa. Eppendorf
Filterspitzen, FX	20 / 200 / 1000	Fa. SLG
Tischzentrifuge, Typ Z 230 MR		Fa. Hermle, Deutschland
Vortexgerät, Typ Genie 2		Fa. Bender& Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad, Typ B3		Fa. Haake
Mastercycler, Typ Gradient		Fa. Eppendorf
Magnetrührer, Typ MR 2002		Fa. Heidolph
Mikrowelle, Typ MC 653		Fa. Europa Style

Spannungsquelle, Typ EPS 500 / 400	Fa. Pharmacia LKB
Minni the Gel cicle – Submarine Agarose Gel Unit,	Fa. Hoefer, USA Typ HE 33
UV – Lampe, Typ N 90 / KW 254 nm	Fa. Uni Equip, Deutschland
Polaroidkamera, Typ Polaroid Gel Cam	Fa. Uni Equip, Deutschland
Tischwaage, Typ P 1200	Fa. Mettler, Deutschland
Spektralphotometer, Typ Anthos	Fa. Anthos Labtec Instruments, Österreich

7.2 Patientinnenliste

laufende Nummer	Labor Nr.	Datum	Name	Geb. Datum	Herkunft Probe	Kultur (Chromagar)	PCR Nr.	PCR Ergebnis
1	1559	25.11.04.	F.F.	21.7.70	Scheide	neg.	I/1	
2	L2	25.11.04.	F.F.	21.7.70	Mund	neg.	I/2	
5	1576	2.12.04	L.J.	22.11.82	Scheide	C.albicans	I/3	
6	L6	2.12.04	L.J.	22.11.82	Mund	C.albicans	I/4	
8	1582	6.12.04	E.M.	5.9.36	Scheide	C.kefyr	I/5	pos.
9	L9	6.12.04	E.M.	5.9.36	Mund	C.kefyr (wenig)	I/6	
12	1581	6.12.04	R.M.	29.5.64	Scheide	neg.	I/7	
13	L13	6.12.04	R.M.	29.5.64	Mund	neg.	I/8	
14	1578	6.12.04	K.E.	5.10.52	Scheide	n.a.	I/9	
15	L15	6.12.04	K.E.	5.10.52	Mund	n.a.	I/10	
16	1589	09.12.04	G.S.	25.05.80	Scheide	n.a.	I/11	
17	L17	09.12.04	G.S.	25.05.80	Mund	n.a.	I/12	
18	1591	09.12.04	H.B.	04.07.85	Scheide	C.albicans	I/13	
19	L19	09.12.04	H.B.	04.07.85	Mund	neg.	I/14	
21	1602	16.12.04	M.A.	23.02.52	Scheide	neg.	I/15	
22	L22	16.12.04	M.A.	23.02.52	Mund	C.albicans	I/16	
23	1603	20.12.04	B.S.	05.07.81	Scheide	neg.	I/17	
24	L24	20.12.04	B.S.	05.07.81	Mund	neg.	I/18	
25	1604	20.12.04	A.L.	26.08.87	Scheide	n.a.	I/19	
26	L26	20.12.04	A.L.	26.08.87	Mund	n.a.	I/20	
27	1605	20.12.04	P.B.	15.02.42	Scheide	n.a.	I/21	
28	L28	20.12.04	P.B.	15.02.42	Mund	n.a.	I/22	
29	1606	20.12.04	S.L.	23.02.57	Scheide	n.a.	I/23	
30	L30	20.12.04	S.L.	23.02.57	Mund	n.a.	I/24	
31	1607	20.12.04	H.A.	01.02.71	Scheide	n.a.	I/25	
32	L32	20.12.04	H.A.	01.02.71	Mund	n.a.	I/26	
35	1625	13.1.05	R.S.	16.06.80	Scheide	neg.	I/27	
36	L41	13.1.05	R.S.	16.06.80	Mund	neg.	I/28	
38	1626	17.1.05	K.S.	09.08.64	Scheide	C.albicans	I/29	
39	L43	17.1.05	K.S.	09.08.64	Mund	C.albicans	I/30	
40	1627	17.1.05	S.G.	25.06.60	Scheide	n.a.	I/31	
41	L45	17.1.05	S.G.	25.06.60	Mund	n.a.	I/32	
42	1628	17.1.05	H.S.	30.05.75	Scheide	n.a.	I/33	schw.pos
43	L47	17.1.05	H.S.	30.05.75	Mund	n.a.	II/1	
44	1629	17.1.05	H.P.	29.03.53	Scheide	n.a.	II/2	pos.
45	L49	17.1.05	H.P.	29.03.53	Mund	n.a.	II/3	
46	1630	17.1.05	F.J.	05.05.67	Scheide	n.a.	II/4	
47	L52	17.1.05	F.J.	05.05.67	Mund	n.a.	II/5	
48	1646	27.01.05.	D.O.	09.02.77	Scheide	C.albicans	II/6	pos.
49	L54	27.01.05.	D.O.	09.02.77	Mund	C.albicans	II/7	pos.
51	1648	27.01.05.	M.P.	27.01.64	Scheide	C.krusei	II/8	pos.
52	L56	27.01.05.	M.P.	27.01.64	Mund	C.krusei	II/9	
53	1649	27.01.05.	E.M.	22.10.71	Scheide	n.a.	II/10	pos.??
54	L58	27.01.05.	E.M.	22.10.71	Mund	n.a.	II/11	
55	1650	27.01.05.	G.C.	10.02.74	Scheide	C.glabrata	II/12	pos.
56	L60	27.01.05.	G.C.	10.02.74	Mund	C.glabrata	II/13	
57	1651	27.01.05.	H.E.	13.03.73	Scheide	C.glabrata	II/14	pos.??
58	L62	27.01.05.	H.E.	13.03.73	Mund	C.glab, C.alb.	II/15	
59	1658	1.2.05	K.M.	19.01.60	Scheide	n.a.	II/16	
60	L64	1.2.05	K.M.	19.01.60	Mund	n.a.	II/17	pos.
61	1659	3.2.05	B.B.	20.08.79	Scheide	n.a.	II/18	
62	L66	3.2.05	B.B.	20.08.79	Mund	n.a.	II/19	

laufende Nummer	Labor Nr.	Datum	Name	Geb. Datum	Herkunft Probe	Kultur (Chromagar)	PCR Nr.	PCR Ergebnis
63	1660	3.2.05	E.A.	04.04.81	Scheide	n.a.	II/20	
64	L68	3.2.05	E.A.	04.04.81	Mund	n.a.	II/21	
65	1661	3.2.05	M.V.	14.03.60	Scheide	C.albicans	II/22	pos.
66	L70	3.2.05	M.V.	14.03.60	Mund	C.albicans	II/23	
67	1663	7.2.05	S.G.	07.06.28	Scheide	C.glab, C.alb.	II/24	pos.
68	L36	7.2.05	S.G.	07.06.28	Mund	C.glab, C.alb.	II/25	
69	1664	7.2.05	B.U.	28.04.63	Scheide	n.a.	II/26	
70	L39	7.2.05	B.U.	28.04.63	Mund	n.a.	II/27	
71	1665	7.2.05	P.E.	23.09.69	Scheide	n.a.	II/28	
72	L72	7.2.05	P.E.	23.09.69	Mund	n.a.	II/29	pos.
73	1666	7.2.05	G.C.	14.03.63	Scheide	n.a.	II/30	
74	L74	7.2.05	G.C.	14.03.63	Mund	n.a.	II/31	
75	1667	7.2.05	N.P.	25.05.72	Scheide	n.a.	II/32	
76	L76	7.2.05	N.P.	25.05.72	Mund	n.a.	II/33	
77	1668	7.2.05	H.C.	11.05.51	Scheide	C.glabrata	III/1	pos.
78	L78	7.2.05	H.C.	11.05.51	Mund	C.glabrata	III/2	pos.
79	1670	10.2.05	V.D.	26.02.66	Scheide	n.a.	III/3	pos.
80	L80	10.2.05	V.D.	26.02.66	Mund	n.a.	III/4	
81	1669	10.2.05	T.A.	16.02.72	Scheide	neg.	III/5	pos.
82	L82	10.2.05	T.A.	16.02.72	Mund	neg.	III/6	
83	1674	14.2.05	W.G.	04.03.59	Scheide	C.albicans	III/7	neg.
84	L84	14.2.05	W.G.	04.03.59	Mund	C.albicans	III/8	
85	1680	14.2.05	S.R.	06.09.44	Scheide	n.a.	III/9	
86	L86	14.2.05	S.R.	06.09.44	Mund	n.a.	III/10	
87	1682	14.2.05	S.R.	17.11.65	Scheide	C.albicans	III/11	pos.
88	L88	14.2.05	S.R.	17.11.65	Mund	neg.	III/12	
89	1686	17.2.05	E.R.	26.10.71	Scheide	C.albicans	III/13	pos.
90	L90	17.2.05	E.R.	26.10.71	Mund	neg.	III/14	
91	1687	17.2.05	W.D.	13.09.73	Scheide	C.albicans	III/15	
92	L92	17.2.05	W.D.	13.09.73	Mund	C.albicans	III/16	
93	1685	17.2.05	R.E.	27.06.84	Scheide	C.albicans	III/17	
94	L94	17.2.05	R.E.	27.06.84	Mund	C.albicans	III/18	
95	1688	17.2.05	H.M.	10.04.81	Scheide	n.a.	III/19	
96	L96	17.2.05	H.M.	10.04.81	Mund	n.a.	III/20	
97	1689	21.2.05	N.H.	18.08.41	Scheide	n.a.	III/21	
98	L98	21.2.05	N.H.	18.08.41	Mund	n.a.	III/22	
99	1690	21.2.05	G.D.	08.06.84	Scheide	n.a.	III/23	
100	L100	21.2.05	G.D.	08.06.84	Mund	n.a.	III/24	
101	1694	24.2.05	F.C.	28.04.70	Scheide	n.a.	III/25	
102	L102	24.2.05	F.C.	28.04.70	Mund	n.a.	III/26	
103	1699	3.3.05	S.T.	18.08.76	Scheide	C.albicans	III/27	
104	L104	3.3.05	S.T.	18.08.76	Mund	neg.	III/28	
105	1698	3.3.05	V.M.	21.11.78	Scheide	neg.	III/29	
106	L106	3.3.05	V.M.	21.11.78	Mund	C.albicans	III/30	
107	1700	3.3.05	D.G.	08.10.64	Scheide	n.a.	III/31	
108	L108	3.3.05	D.G.	08.10.64	Mund	n.a.	III/32	
109	1704	3.3.05	G.D.	05.07.79	Scheide	n.a.	III/33	
110	L110	3.3.05	G.D.	05.07.79	Mund	n.a.	IV/1	
113	1712	7.3.05	R.W.	04.05.59	Scheide	n.a.	IV/2	
114	L114	7.3.05	R.W.	04.05.59	Mund	n.a.	IV/3	pos.
115	1713	10.3.05	M.Y.	09.09.76	Scheide	neg.	IV/4	
116	L116	10.3.05	M.Y.	09.09.76	Mund	C.albicans	IV/5	
117	1714	10.3.05	Z.G.	24.01.68	Scheide	n.a.	IV/6	
118	L118	10.3.05	Z.G.	24.01.68	Mund	n.a.	IV/7	
119	1739	31.3.05	L.N.	22.04.74	Scheide	n.a.	IV/8	
120	L120	31.3.05	L.N.	22.04.74	Mund	n.a.	IV/9	

laufende Nummer	Labor Nr.	Datum	Name	Geb. Datum	Herkunft Probe	Kultur (Chromagar)	PCR Nr.	PCR Ergebnis
121	1740	31.3.05	B.E.	25.10.83	Scheide	neg.	IV/10	
122	L122	31.3.05	B.E.	25.10.83	Mund	neg.	IV/11	
123	1741	31.3.05	B.S.	01.05.85	Scheide	C.albicans	IV/12	
124	L124	31.3.05	B.S.	01.05.85	Mund	neg.	IV/13	
125	1742	31.3.05	H.M.	01.02.43	Scheide	C.glabrata	IV/14	
126	L126	31.3.05	H.M.	01.02.43	Mund	C.glabrata	IV/15	
127	1743	31.3.05	F.L.	18.04.47	Scheide	n.a.	IV/16	
128	L128	31.3.05	F.L.	18.04.47	Mund	n.a.	IV/17	
129	1744	31.3.05	D.C.	31.05.40	Scheide	n.a.	IV/18	
130	L130	31.3.05	D.C.	31.05.40	Mund	n.a.	IV/19	
131	1745	31.3.05	K.R.	20.08.50	Scheide	n.a.	IV/20	
132	L132	31.3.05	K.R.	20.08.50	Mund	n.a.	IV/21	
133	1746	31.3.05	H.E.	18.02.44	Scheide	neg.	IV/22	pos.
134	L134	31.3.05	H.E.	18.02.44	Mund	C.albicans	IV/23	
135	1748	4.4.05	T.L.	14.12.67	Scheide	n.a.	IV/24	
136	L136	4.4.05	T.L.	14.12.67	Mund	n.a.	IV/25	
137	1750	4.4.05	S.R.	17.11.65	Scheide	n.a.	IV/26	
138	L138	4.4.05	S.R.	17.11.65	Mund	n.a.	IV/27	
139	1756	4.4.05	G.M.	29.06.71	Scheide	C.albicans	IV/28	
140	L140	4.4.05	G.M.	29.06.71	Mund	C.albicans	IV/29	
141	1757	7.4.05	B.L.	16.08.81	Scheide	neg.	IV/30	
142	L142	7.4.05	B.L.	16.08.81	Mund	C.albicans	IV/31	
143	1758	7.4.05	H.C.	12.09.75	Scheide	n.a.	IV/32	
144	L144	7.4.05	H.C.	12.09.75	Mund	n.a.	IV/33	
145	1760	7.4.05	B.D.	30.04.78	Scheide	neg.	V/1	
146	L146	7.4.05	B.D.	30.04.78	Mund	C.albicans	V/2	
147	1762	11.4.05	M.V.	12.10.49	Scheide	n.a.	V/3	
148	L148	11.4.05	M.V.	12.10.49	Mund	n.a.	V/4	
149	1763	11.4.05	S.E.	05.08.65	Scheide	n.a.	V/5	
150	L150	11.4.05	S.E.	05.08.65	Mund	n.a.	V/6	pos.
151	1764	11.4.05	W.K.	25.09.73	Scheide	n.a.	V/7	
152	L152	11.4.05	W.K.	25.09.73	Mund	n.a.	V/8	
153	1766	11.4.05	K.J.	28.04.52	Scheide	n.a.	V/9	pos.
154	L154	11.4.05	K.J.	28.04.52	Mund	n.a.	V/10	
155	1767	11.4.05	G.S.	21.08.46	Scheide	n.a.	V/11	
156	L156	11.4.05	G.S.	21.08.46	Mund	n.a.	V/12	
158	1787	21.4.05	G.Z.	25.02.72	Scheide	n.a.	V/13	
159	L159	21.4.05	G.Z.	25.02.72	Mund	n.a.	V/14	
160	1801	28.4.05	S.S.	01.03.77	Scheide	ned	V/15	pos.
161	L161	28.4.05	S.S.	01.03.77	Mund	C.albicans	V/16	
162	1802	28.4.05	V.A.	30.12.77	Scheide	C.albicans	V/17	pos.
163	L163	28.4.05	V.A.	30.12.77	Mund	C.albicans	V/18	
164	1822	12.5.05	A.E.	23.12.34	Scheide		V/19	
165	L165	12.5.05	A.E.	23.12.34	Mund		V/20	
166	1820	12.5.05	S.M.	21.05.82	Scheide		V/21	
167	L167	12.5.05	S.M.	21.05.82	Mund		V/22	
168	1819	12.5.05	R.R.	03.06.39	Scheide		V/23	
169	L169	12.5.05	R.R.	03.06.39	Mund		V/24	
170	1850	2.6.05	J.A.	30.09.57	Scheide	n.a.	V/25	
171	L171	2.6.05	J.A.	30.09.57	Mund	n.a.	V/26	
172	1851	6.6.05	S.J.	19.04.56	Scheide	n.a.	V/27	
173	L173	6.6.05	S.J.	19.04.56	Mund	n.a.	V/28	
174	1852	6.6.05	F.S.	30.10.58	Scheide	n.a.	V/29	
175	L175	6.6.05	F.S.	30.10.58	Mund	n.a.	V/30	
176	1853	6.6.05	R.W.	04.05.59	Scheide	n.a.	V/31	
177	L177	6.6.05	R.W.	04.05.59	Mund	n.a.	V/32	

laufende Nummer	Labor Nr.	Datum	Name	Geb. Datum	Herkunft Probe	Kultur (Chromagar)	PCR Nr.	PCR Ergebnis
178	1858	8.6.05	O.J.	04.04.86	Scheide	n.a.	V/33	
179	L179	8.6.05	O.J.	04.04.86	Mund	n.a.	VI/1	
180	1873	16.6.05	D.K.	17.03.62	Scheide	C.albicans	VI/2	pos.
181	L181	16.6.05	D.K.	17.03.62	Mund	C.albicans	VI/3	
182	1884	23.6.05	W.S.	14.05.87	Scheide	n.a.	VI/4	
183	L183	23.6.05	W.S.	14.05.87	Mund	n.a.	VI/5	
184	1885	23.6.05	G.M.	13.10.82	Scheide	C.albicans	VI/6	
185	L185	23.6.05	G.M.	13.10.82	Mund	C.albicans	VI/7	pos.
186	1886	23.6.05	Z.B.	01.12.64	Scheide	n.a.	VI/8	
187	L187	23.6.05	Z.B.	01.12.64	Mund	n.a.	VI/9	
188	1887	23.6.05	T.P.	27.09.68	Scheide	C.albicans	VI/10	pos.
189	L189	23.6.05	T.P.	27.09.68	Mund	neg.	VI/11	
190	1910	4.7.05	H.R.	29.11.54	Scheide	C.albicans	VI/12	
191	L191	4.7.05	H.R.	29.11.54	Mund	C.albicans	VI/13	
192	1909	4.7.05	U.I.	16.08.61	Scheide	n.a.	VI/14	
193	L193	4.7.05	U.I.	16.08.61	Mund	n.a.	VI/15	
194	1911	4.7.05	A.G.	31.03.34	Scheide	C.glab, C.alb.	VI/16	
195	L195	4.7.05	A.G.	31.03.34	Mund	C.glab, C.alb.	VI/17	
196	1912	4.7.05	G.C.	10.02.74	Scheide	C.glabrata	VI/18	
197	L197	4.7.05	G.C.	10.02.74	Mund	C.albicans	VI/19	
198	1913	4.7.05	S.M.	13.12.74	Scheide	C.albicans	VI/20	
199	L199	4.7.05	S.M.	13.12.74	Mund	C.albicans	VI/21	
200	1914	4.7.05	K.D.	19.02.56	Scheide	n.a.	VI/22	
201	L201	4.7.05	K.D.	19.02.56	Mund	n.a.	VI/23	
202	1917	4.7.05	B.I.	22.08.64	Scheide	neg.	VI/24	pos.
203	L203	4.7.05	B.I.	22.08.64	Mund	C.albicans	VI/25	
204	1907	30.6.05	J.R.	27.01.45	Scheide	n.a.	VI/26	
205	L205	30.6.05	J.R.	27.01.45	Mund	n.a.	VI/27	
206	1906	30.6.05	E.J.	20.06.81	Scheide	C.albicans	VI/28	
207	L207	30.6.05	E.J.	20.06.81	Mund	neg.	VI/29	
208	1908	30.6.05	W.S.	27.02.82	Scheide	n.a.	VI/30	
209	L209	30.6.05	W.S.	27.02.82	Mund	n.a.	VI/31	
210	1923	11.7.05	F.A.	09.08.67	Scheide	neg.	VI/32	
211	L211	11.7.05	F.A.	09.08.67	Mund	C.albicans	VI/33	
212	1928	11.7.05	E.M.	05.09.36	Scheide	n.a.	VII/1	
213	L213	11.7.05	E.M.	05.09.36	Mund	n.a.	VII/2	pos.
214	1926	11.7.05	B.E.	24.07.61	Scheide	n.a.	VII/3	
215	L215	11.7.05	B.E.	24.07.61	Mund	n.a.	VII/4	
216	1922	11.7.05	S.C.	22.05.67	Scheide	C.albicans	VII/5	
217	L217	11.7.05	S.C.	22.05.67	Mund	C.glab, C.alb.	VII/6	
218	1921	11.7.05	K.R.	07.06.48	Scheide	neg.	VII/7	
219	L219	11.7.05	K.R.	07.06.48	Mund	C.glabrata	VII/8	
220	1924	11.7.05	Y.M.	24.02.64	Scheide	n.a.	VII/9	
221	L221	11.7.05	Y.M.	24.02.64	Mund	n.a.	VII/10	
222	1925	11.7.05	E.G.	16.02.54	Scheide	n.a.	VII/11	
223	L223	11.7.05	E.G.	16.02.54	Mund	n.a.	VII/12	
224	1929	11.7.05	D.P.	23.03.70	Scheide	Sacharomyces	VII/13	pos.
225	L225	11.7.05	D.P.	23.03.70	Mund	C.albicans	VII/14	
226	1927	11.7.05	W.K.	09.10.58	Scheide	n.a.	VII/15	
227	L227	11.7.05	W.K.	09.10.58	Mund	n.a.	VII/16	
228	1941	18.7.05	P.D.	11.12.62	Scheide	n.a.	VII/17	
229	L229	18.7.05	P.D.	11.12.62	Mund	n.a.	VII/18	
230	1946	18.7.05	W.G.	04.03.59	Scheide	neg.	VII/19	
231	L231	18.7.05	W.G.	04.03.59	Mund	C.albicans	VII/20	
232	1947	18.7.05	M.A.	27.12.68	Scheide	n.a.	VII/21	
233	L233	18.7.05	M.A.	27.12.68	Mund	n.a.	VII/22	

laufende Nummer	Labor Nr.	Datum	Name	Geb. Datum	Herkunft Probe	Kultur (Chromagar)	PCR Nr.	PCR Ergebnis
234	1943	18.7.05	W.S.	11.11.63	Scheide	neg.	VII/23	neg.
235	L235	18.7.05	W.S.	11.11.63	Mund	neg.	VII/24	
236	1945	18.7.05	T.M.	30.04.48	Scheide	n.a.	VII/25	
237	L237	18.7.05	T.M.	30.04.48	Mund	n.a.	VII/26	
238	1960	25.7.05	K.K.	28.12.61	Scheide	C.albicans	VII/27	pos.
239	L239	25.7.05	K.K.	28.12.61	Mund	C.albicans	VII/28	
240	1961	25.7.05	G.S.	21.08.46	Scheide	n.a.	VII/29	
241	L241	25.7.05	G.S.	21.08.46	Mund	n.a.	VII/30	
242	1955	25.7.05	H.U.	15.03.68	Scheide	n.a.	VII/31	
243	L243	25.7.05	H.U.	15.03.68	Mund	n.a.	VII/32	
244	1962	25.7.05	A.L.	31.10.46	Scheide	n.a.	VII/33	
245	L245	25.7.05	A.L.	31.10.46	Mund	n.a.	VIII/1	
246	1959	25.7.05	L.A.	12.10.64	Scheide	C.albicans	VIII/2	
247	L247	25.7.05	L.A.	12.10.64	Mund	C.albicans	VIII/3	
248	1958	25.7.05	K.A.	07.11.69	Scheide	C.albicans	VIII/4	
249	L249	25.7.05	K.A.	07.11.69	Mund	neg.	VIII/5	
250	1956	25.7.05	S.M.	30.09.37	Scheide	neg.	VIII/6	
251	L251	25.7.05	S.M.	30.09.37	Mund	C.glabrata	VIII/7	
252	1957		M.G.	07.09.63	Scheide	n.a.	VIII/8	
253	L253		M.G.	07.09.63	Mund	n.a.	VIII/9	
256	1976	4.8.05	S.K.	04.01.45	Scheide	n.a.	VIII/10	
257	L257	4.8.05	S.K.	04.01.45	Mund	n.a.	VIII/11	
258	1977	4.8.05	W.B.	26.08.76	Scheide	n.a.	VIII/12	
259	L259	4.8.05	W.B.	26.08.76	Mund	n.a.	VIII/13	
260	1981	4.8.05	M.A.	17.11.80	Scheide	n.a.	VIII/14	
261	L261	4.8.05	M.A.	17.11.80	Mund	n.a.	VIII/15	
262	1982	4.8.05	F.A.	31.10.50	Scheide	n.a.	VIII/16	
263	L263	4.8.05	F.A.	31.10.50	Mund	n.a.	VIII/17	
264	1983	4.8.05	H.D.	24.12.65	Scheide	n.a.	VIII/18	
265	L265	4.8.05	H.D.	24.12.65	Mund	C.glabrata	VIII/19	
266	1997	8.8.05	E.K.	27.02.65	Scheide	n.a.	VIII/20	
267	L267	8.8.05	E.K.	27.02.65	Mund	n.a.	VIII/21	
268	1996	8.8.05	R.K.	13.12.73	Scheide	n.a.	VIII/22	
269	L269	8.8.05	R.K.	13.12.73	Mund	n.a.	VIII/23	
270	1994	8.8.05	K.G.	19.02.49	Scheide	C.albicans	VIII/24	pos.
271	L271	8.8.05	K.G.	19.02.49	Mund	n.a.	VIII/25	
272	1993	8.8.05	B.I.	22.08.64	Scheide	n.a.	VIII/26	
273	L273	8.8.05	B.I.	22.08.64	Mund	n.a.	VIII/27	
276	1995	8.8.05	K.H.	10.06.40	Scheide	neg.	VIII/28	
277	L277	8.8.05	K.H.	10.06.40	Mund	C.glabrata	VIII/29	pos.
278	1984	8.8.05	S.K.	30.03.73	Scheide	C.glabrata	VIII/30	pos.
279	L279	8.8.05	S.K.	30.03.73	Mund	C.albicans	VIII/31	
280	1992	8.8.05	S.G.	06.08.49	Scheide	n.a.	VIII/32	
281	L281	8.8.05	S.G.	06.08.49	Mund	n.a.	VIII/33	
282	1987	8.8.05	G.I.	05.03.29	Scheide	n.a.	IX/1	
283	L283	8.8.05	G.I.	05.03.29	Mund	n.a.	IX/2	
284	1986	8.8.05	H.A.	18.05.72	Scheide	n.a.	IX/3	pos.??
285	L285	8.8.05	H.A.	18.05.72	Mund	C.albicans	IX/4	
286	1985	8.8.05	S.C.	22.05.67	Scheide	n.a.	IX/5	
287	L287	8.8.05	S.C.	22.05.67	Mund	C.glabrata	IX/6	
288	2000	11.8.05	F.B.	06.12.66	Scheide	n.a.	IX/7	
289	L289	11.8.05	F.B.	06.12.66	Mund	n.a.	IX/8	
290	2001	11.8.05	W.M.	25.02.48	Scheide	n.a.	IX/9	
291	L291	11.8.05	W.M.	25.02.48	Mund	n.a.	IX/10	
292	2002	11.8.05	L.T.	22.01.62	Scheide		IX/11	pos.??
293	L293	11.8.05	L.T.	22.01.62	Mund		IX/12	

laufende Nummer	Labor Nr.	Datum	Name	Geb. Datum	Herkunft Probe	Kultur (Chromagar)	PCR Nr.	PCR Ergebnis
294	2010	18.8.05	S.G.	08.04.54	Scheide	n.a.	IX/13	pos.??
295	L295	18.8.05	S.G.	08.04.54	Mund	n.a.	IX/14	
296	2011	18.8.05	G.E.	04.09.57	Scheide	n.a.	IX/15	
297	L297	18.8.05	G.E.	04.09.57	Mund	n.a.	IX/16	
298	2012	18.8.05	W.S.	30.06.82	Scheide	n.a.	IX/17	
299	L299	18.8.05	W.S.	30.06.82	Mund	n.a.	IX/18	
300	2024	25.8.05	H.F.	07.02.78	Scheide	n.a.	IX/19	
301	L301	25.8.05	H.F.	07.02.78	Mund	n.a.	IX/20	
302	2056	15.9.05	L.M.	11.05.62	Scheide	n.a.	IX/21	
303	L303	15.9.05	L.M.	11.05.62	Mund	n.a.	IX/22	
304	2079	26.9.05	H.D.	04.08.67	Scheide	n.a.	IX/23	
305	L305	26.9.05	H.D.	04.08.67	Mund	n.a.	IX/24	
306	2078	26.9.05	N.H.	18.08.41	Scheide	n.a.	IX/25	
307	L307	26.9.05	N.H.	18.08.41	Mund	n.a.	IX/26	
308	2077	26.9.05	W.S.	29.08.53	Scheide	n.a.	IX/27	
309	L309	26.9.05	W.S.	29.08.53	Mund	n.a.	IX/28	

Laufende Nummer	Purgene PCR	IL-4	IL - 10	IL - 12	Gruppe	Symptome 1=Brennen, Jucken, 2=Fluor, 3=Rötung	Reinheitsgrad (Zahl)
1	kein 2. Pellet!	4,9	2,7	4,1	4,0	1	
2		2,2	0,4	3,0	4,0		
5	kein 2. Pellet!	1,2	2,0	0,0	1,0	1,2,3	1
6		23,4	0,9	-0,7	1,0		
8	kein 2. Pellet!	24,4	0,0	26,0	1,0		
9		7,2	0,6	2,4	1,0		
12	kein 2. Pellet!	0,9	2,2	26,9	4,0		
13		4,5	2,0	3,0	4,0		
14	kein 2. Pellet!	7,2	-0,3	0,0	4,0		
15		3,7	1,3	-0,1	4,0		
16	kein 2. Pellet!	5,2	2,2	2,6	4,0	1,2,3	1
17		4,2	0,4	0,7	4,0		
18	kein 2. Pellet!	12,6	1,8	2,0	3,0	1,2	1
19		4,5	0,6	0,6	3,0		
21	kein 2. Pellet!	7,2	2,5	0,0	2,0	1	
22		15,8	5,5	3,0	2,0		
23	kein 2. Pellet!	7,3	2,2	0,0	4,0		
24		2,0	0,2	-4,2	4,0		
25	kein 2. Pellet!	42,7	0,4	0,0	4,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	
26		7,2	-1,8	63,4	4,0		
27	kein 2. Pellet!	1,5	-0,3	1252	4		
28		3,0	0,7	1,1	4,0		
29	kein 2. Pellet!	4,4	1,8	2,8	4,0		
30		1,8	0,2	1,1	4,0		
31	kein 2. Pellet!	7,7	2,5	2,0	4,0	1,2	
32		0,1	0,9	-1,1	4,0		
35	kein 2. Pellet	3,6	1,1	89,1	4,0	1,2,3	2
36		3,5	0,0	3,7	4,0		
38	neg.	2,2	-0,3	0,0	1,0		
39		2,3	0,4	183,2	1,0		
40	neg.	3,7	1,3	4,9	4,0		
41		5,5	-0,5	3,8	4,0		
42		2,3	2,5	0,0	3,0		
43		-0,4	1,1	-0,7	3,0		
44	pos.	16,6	2,5	16,6	3,0		
45		2,8	0,2	1,7	3,0		
46	neg.	2,4	-0,5	226	4	2	2
47		9,6	-0,5	-2,3	4,0		
48		14,9	0,7	0,0	1,0	1,2,3	1
49		6,2	0,0	-0,4	1,0		
51		17,3	-1,3	0,0	1,0		
52		1,0	-1,7	-1,9	1,0		
53	neg.	61,9	???	0,0	4,0		
54		12,3	22,2	-1,0	4,0		
55		11,8	???	0,0	1,0		
56		8,1	0,1	0,5	1,0		
57	neg.	44,0	1,0	7,5	1,0		
58		3,0	-1,3	1,8	1,0		
59	neg.	139,3	41,2	161,5	4,0		
60		6,7	0,3	-0,8	4,0		
61	neg.	16,3	-1,3	0,0	4,0	1,2,3	1
62		20,4	13,4	-1,1	4,0		
63	neg.	2,6	-1,2	5,7	4,0	1,2,3	1

Laufende Nummer	Purgene PCR	IL-4	IL - 10	IL - 12	Gruppe	Symptome 1=Brennen, Jucken, 2=Fluor, 3=Rötung	Reinheitsgrad (Zahl)
64		21,3	235,1	-0,8	4,0		
65		12,2	-2,1	0,0	1,0	1	2
66		2,3	-4,1	2,3	1,0		
67		11,3	-0,4	0,0	1,0		
68		-0,2	0,5	-5,5	1,0		
69	pos.	8,0	-0,2	0,1	4,0		
70		1,2	-1,5	-0,7	4,0		
71	pos.	9,6	-2,5	0,0	4,0		
72		12,1	41,2	-1,0	4,0		
73	neg.	23,4	1,4	4,9	4,0		
74		0,5	-1,5	-0,5	4,0		
75	pos.	19,7	8,1	9,3	4,0		
76		4,0	-0,1	-1,4	4,0		
77		19,5	0,7	0,0	1,0		
78		4,5	-1,9	196,7	1,0		
79		7,5	2,7	2,5	4,0	1	2
80		19,6	26,3	-1,3	4,0		
81		6,9	-1,5	7,9	4,0	1,2,3	2
82		14,4	8,6	-1,2	4,0		
83	neg.	28,1	0,7	0,9	1,0		
84		0,3	-0,1	-1,0	1,0		
85	neg.	4,2	-0,1	0,4	4,0		
86		1,2	-0,6	1,8	4,0		
87		7,8	-2,1	2,3	3,0		
88		1,8	-1,7	1,5	3,0		
89		30,5	-1,9	20,1	3,0		
90		8,3	-2,5	-1,8	3,0		
91	pos.	22,9	0,5	1,7	1,0		
92		0,4	1,4	-3,7	1,0		
93	pos.	10,2	-0,8	5,5	1,0		
94		13,3	-5,2	0,0	1,0		
95	neg.	1,4	-0,8	1,4	4,0		
96		9,6	-1,7	-1,2	4,0		
97	neg.	11,1	-0,8	6,3	4,0		
98		5,6	-2,1	-0,8	4,0		
99	neg.	4,8	-0,1	2,0	4,0		
100		10,2	0,1	-1,3	4,0		
101	neg.	49,3	23,9	12,7	4,0	1,2,3	1
102		4,4	-0,6	0,6	4,0		
103	pos.	11,8	-0,2	8,0	3,0		
104		4,2	-4,8	-4,3	3,0		
105	neg.	3,5	-1,9	0,0	2,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	
106		5,2	-0,1	2,7	2,0		
107	pos.	14,7	0,3	2,5	4,0	1	
108		-0,4	0,1	-3,5	4,0		
109	neg.	3,8	0,1	2,9	4,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	
110		-0,4	12,1	4,0	4,0		
113	pos.	0,4	0,7	79,8	4,0		
114		5,0	-1,3	3,5	4,0		
115	pos.	56,7	-0,2	12,9	1,0		
116		19,4	69,3	7,6	1,0		
117	neg.	8,4	2,0	1,2	4,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	

Laufende Nummer	Purgene PCR	IL-4	IL - 10	IL - 12	Gruppe	Symptome 1=Brennen, Jucken, 2=Fluor, 3=Rötung	Reinheitsgrad (Zahl)
118		5,2	2,0	-2,2	4,0		
119	neg.	0,9	-0,6	1,4	4,0	1	1
120		16,9	-0,6	-0,4	4,0		
121	neg.	10,1	2,7	1,6	4,0	1,2	1
122		8,5	-0,2	-0,2	4,0		
123	kein 2.Pellet!	28,0	19,0	15,4	3,0	1	1
124		17,5	9,0	0,9	3,0		
125	pos.	1,8	18,8	4,0	1,0		
126		0,0	3,8	-1,8	1,0		
127	neg.	17,3	0,1	3,3	4,0		
128		1,2	-0,8	-0,3	4,0		
129	neg.	6,1	2,7	9,7	4,0		
130		9,4	-1,5	-1,2	4,0		
131	pos.	25,7	-0,6	1,0	4,0		
132		1,0	-0,6	-0,4	4,0		
133		6,4	-0,2	6,6	1,0		
134		0,8	0,9	0,3	1,0		
135	pos.	5,8	???	4,8	4,0		
136		10,6	-1,2	0,2	4,0		
137	neg.	224,5	22,7	13,4	4,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	
138		3,6	5,3	0,5	4,0		
139	pos.	16,2	3,9	4,6	1,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	
140		2,8	0,7	-0,8	1,0		
141	kein 2.Pellet!	8,1	3,0	0,0	2,0	1,2,3	1
142		6,7	3,2	-1,6	2,0		
143	neg.	12,1	4,8	1,9	4,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	
144		2,6	0,2	0,5	4,0		
145	pos.	7,9	3,2	2,2	1,0	1,2	
146		3,4	3,7	1,6	1,0		
147	neg.	8,8	2,5	0,0	4,0		
148		2,2	-1,2	3,1	4,0		
149	neg.	2,6	1,2	0,0	4,0		
150		10,4	38,0	-4,7	4,0		
151	neg.	12,7	4,2	5,2	4,0		
152		14,1	14,5	0,6	4,0		
153		7,0	9,0	6,8	3,0		
154		4,0	5,3	-1,2	3,0		
155	neg.	43,8	3,4	5,4	4,0	2,3	
156		2,6	-2,1	-2,1	4,0		
158	neg.	6,1	1,6	3,6	4,0	1,2,3	2
159		0,6	3,5	0,2	4,0		
160		9,4	3,9	3,9	1,0	1,2,3	1
161		9,8	2,5	0,1	1,0		
162		3,2	7,4	24,4	1,0	1,2	1
163		3,2	1,8	-2,0	1,0		
164	neg.	8,4	1,1	0,0	4,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	
165		5,9	-1,1	-0,5	4,0		
166	neg.	16,9	2,3	0,0	4,0	1,2	1
167		2,2	2,8	-2,3	4,0		
168	neg.	6,6	6,2	7,0	4,0	1,2	1
169		3,0	0,5	2,1	4,0		

Laufende Nummer	Purgene PCR	IL-4	IL - 10	IL - 12	Gruppe	Symptome 1=Brennen, Jucken, 2=Fluor, 3=Rötung	Reinheitsgrad (Zahl)
170	neg.	2,7	1,8	2,9	4,0	1,2,3	1
171		5,6	1,2	1,3	4,0		
172	neg.	12,2	3,4	1,7	4,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	
173		6,1	-0,4	-0,1	4,0		
174	neg.	10,5	7,2	8,8	4,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	
175		8,4	8,0	4,1	4,0		
176	neg.	0,0	10,8	6,8	4,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	
177		1,5	1,2	-1,9	4,0		
178	kein 2.Pellet!	3,4	2,8	0,0	4,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	
179		0,8	3,9	-2,3	4,0		
180		5,1	3,2	0,0	1,0	2	1
181		1,5	2,3	-1,9	1,0		
182	kein 2.Pellet!	2,6	0,0	0,0	4,0	1,2	1
183		4,0	3,9	-3,1	4,0		
184	kein 2.Pellet!	6,1	1,8	0,0	1,0	1,2	1
185		6,9	3,5	0,9	1,0		
186	kein 2.Pellet!	5,7	0,7	0,0	4,0	1	1
187		2,3	1,6	1,3	4,0		
188		3,0	0,4	0,5	3,0		3
189		1,5	1,8	6,9	3,0		
190	neg.	14,4	2,3	4,5	1,0		
191		-0,4	2,5	-0,7	1,0		
192	neg.	8,2	0,5	0,0	4,0		
193		6,3	2,5	0,5	4,0		
194	neg.	3,8	0,2	9,3	1,0		
195		2,7	0,5	1,3	1,0		
196	kein 2.Pellet!	15,5	0,0	0,0	1,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	
197		6,1	3,9	0,5	1,0		
198	neg.	10,9	0,0	1,4	1,0	1,2,3	
199		1,3	2,5	-3,5	1,0		
200	kein 2.Pellet!	2,6	15,7	72,7	4,0		
201		2,6	3,7	-1,1	4,0		
202		0,1	0,0	3,9	1,0	1,2,3	
203		7,6	2,5	0,5	1,0		
204	neg.	1,9	23,7	37,7	4,0	1,2	1
205		1,9	2,5	5,7	4,0		
206	pos.	7,0	1,7	0,0	3,0	1	3
207		7,3	6,4	1,3	3,0		
208	neg.	7,2	1,0	1,8	4,0	1	1
209		1,3	3,0	-1,1	4,0		
210	neg.	6,5	0,0	12,7	2,0	2	
211		4,7	-0,4	0,9	2,0		
212	neg.	11,2	0,0	11,2	4,0	1	
213		0,2	0,5	0,5	4,0		
214	neg.	13,3	3,6	7,6	4,0	1,2,3	
215		8,1	3,2	-3,5	4,0		
216	pos.	7,8	0,0	3,4	1,0		
217		1,9	4,4	-2,7	1,0		
218	neg.	3,8	0,0	5,2	2,0	2	
219		4,1	1,8	0,9	2,0		

Laufende Nummer	Purgene PCR	IL-4	IL - 10	IL - 12	Gruppe	Symptome 1=Brennen, Jucken, 2=Fluor, 3=Rötung	Reinheitsgrad (Zahl)
220	neg.	7,0	0,0	12,8	4,0	1,2,3	
221		2,7	-0,5	-0,3	4,0		
222	neg.	9,3	0,3	9,3	4,0		
223		-0,1	0,0	-5,0	4,0		
224		2,4	0,0	4,2	1,0	1	
225		4,3	0,5	8,5	1,0		
226	pos.	2,7	17,7	2,6	3,0	2	
227		3,1	-1,1	2,5	3,0		
228	pos.	1,4	0,0	2,0	3,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	
229		0,9	3,2	-1,5	3,0		
230	neg.	1,3	2,5	1,4	2,0		
231		-1,1	2,8	-5,4	2,0		
232	pos.	2,9	0,0	10,8	3,0		
233		4,8	3,7	-8,7	3,0		
234		1,6	0,0	36,0	4,0	1	
235		18,5	55,1	6,1	4,0		
236	pos.	8,1	0,0	5,2	3,0		
237		0,6	3,0	42,0	3,0		
238		4,4	0,0	3,4	1,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	
239		6,3	16,6	-2,3	1,0		
240	neg.	9,1	0,0	2,5	4,0	2,3	
241		-0,2	1,9	-3,1	4,0		
242	pos.	2,1	0,0	1,8	3,0		
243		0,0	0,0	-1,9	3,0		
244	pos.	13,4	0,0	5,7	3,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	
245		-1,1	4,8	5,7	3,0		
246	neg.	3,8	0,0	2,4	1,0	1,2,3	
247		1,5	2,6	-5,0	1,0		
248	pos.	5,6	0,0	2,1	3,0		
249		0,5	2,6	-2,7	3,0		
250	neg.	4,8	0,0	18,0	2,0	1	
251		0,9	-8,0	45,1	2,0		
252	neg.	5,9	0,0	0,5	4,0		
253		1,0	-9,2	0,5	4,0		
256	neg.	4,5	0,0	2,2	4,0	1	
257		0,6	-9,5	0,9	4,0		
258	neg.	0,0	0,0	0,0	4,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	
259		5,9	-8,3	13,8	4,0		
260	neg.	4,1	0,0	2,5	4,0	1,2,3	
261		3,8	-9,5	-1,6	4,0		
262	pos.	4,1	0,0	5,6	3,0	1,2,3	
263		2,6	-6,8	1,9	3,0		
264	neg.	3,2	0,0	4,2	2,0	1,2,3	
265		0,6	-10,8	1,0	2,0		
266	pos.	10,1	5,1	6,1	3,0		
267		11,9	39,4	11,5	3,0		
268	neg.	5,4	6,7	3,0	4,0		
269		17,5	201,1	19,5	4,0		
270		0,4	16,3	5,6	3,0	1,2	
271		4,5	-11,4	-3,9	3,0		
272	neg.	1,0	0,0	0,3	4,0	siehe 202	

Laufende Nummer	Purgene PCR	IL-4	IL - 10	IL - 12	Gruppe	Symptome 1=Brennen, Jucken, 2=Fluor, 3=Rötung	Reinheitsgrad (Zahl)
273		10,7	61,0	6,1	4,0		
276	pos.	5,4	4,6	7,5	1,0		
277		8,2	-9,5	36,3	1,0		
278		6,1	0,0	4,8	1,0		
279		16,5	41,7	11,9	1,0		
280	neg.	45,8	0,0	2,8	4,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	
281		2,8	-10,5	-1,8	4,0		
282	neg.	1,9	17,9	5,2	4,0	2	
283		5,0	-2,4	-1,3	4,0		
284	neg.	3,8	0,5	3,4	2,0	1,2	
285		8,9	-13,9	-0,2	2,0		
286	pos.	3,5	0,0	2,8	1,0	2	
287		3,7	-14,8	-0,6	1,0		
288	pos.	0,0	4,2	13,0	3,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	
289		5,5	-12,6	-4,2	3,0		
290	kein 2.Pellet!	4,8	6,4	6,1	4,0	2	
291		0,4	-7,7	2,6	4,0		
292	neg.	0,0	11,0	26,3	4,0	1,2	2
293		12,3	36,7	5,0	4,0		
294	pos.	0,0	24,6	39,1	3,0	1,2	
295		14,3	46,8	12,8	3,0		
296	pos.	10,8	2,6	8,5	3,0	1	
297		1,6	-7,1	3,6	3,0		
298	pos.	2,4	5,5	0,8	3,0	1,2	
299		10,7	76,5	7,1	3,0		
300	neg.	67,0	54,5	198,2	4,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	
301		7,0	3,6	6,2	4,0		
302	neg.	0,0	0,0	4,3	4,0		
303		2,0	-6,2	0,0	4,0		
304	pos.	3,8	0,0	4,3	3,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	
305		2,3	-5,0	-2,0	3,0		
306	neg.	4,1	0,0	3,0	4,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	
307		1,6	-4,7	0,1	4,0		
308	neg.	3,0	0,0	5,0	4,0	KEIN FRAGEBOGEN VORHANDEN	
309		11,4	80,9	15,7	4,0		

laufende Nummer	Leukozyten 1=ja, 2=nein	Vermutliche Diagnose 1=akute Pilzi., 2=bakt. Vaginose, 3=CRVVC, 4=Bakt. Dysbiose	Schwangerschaft 1=ja, 2=nein	PA_Behandlung 1=ja, 2=nein	Regelmäßige PZR 1=ja, 2=nein
1	2	1	2	1	2
2					
5	2	1	2	2	2
6					
8	2	1	2	2	2
9					
12	2	3	2	1	1
13					
14	2		1	2	2
15					
16	1	3	2	2	2
17					
18	2	3	2	2	2
19					
21	2		2	2	2
22					
23	2	3	2	2	2
24					
25					
26					
27	2		2	1	1
28					
29	2		2	2	2
30					
31	2		2	2	2
32					
35	2	3	2	2	2
36					
38	2		2	1	1
39					
40	2	2	2	2	1
41					
42	2	2	2	2	2
43					
44	2	1	2	1	1
45					
46	2	1	2	2	1
47					
48	2	3	2	2	2
49					
51	2		2	2	1
52					
53	2		1	1	2
54					
55	2	1	1	2	1
56					
57	2	3	2	1	1
58					
59	2		2	1	1
60					
61	2	3	2	2	2

laufende Nummer	Leukozyten 1=ja, 2=nein	Vermutliche Diagnose 1=akute Pilzi., 2=bakt. Vaginose, 3=CRVVC, 4=Bakt. Dysbiose	Schwangerschaft 1=ja, 2=nein	PA_Behandlung 1=ja, 2=nein	Regelmäßige PZR 1=ja, 2=nein
62					
63	2	3	2	1	1
64					
65	2	3	2	2	2
66					
67	2		2	2	2
68					
69	2		2	1	1
70					
71	2		2	1	1
72					
73	2		2	1	1
74					
75	2		2	1	2
76					
77	2	2,3	2	1	2
78					
79	1	4	2	2	2
80					
81	1	3	2	2	2
82					
83	2	2	2	2	1
84					
85	2		2	2	2
86					
87	2	3	2	1	1
88					
89	2	3	2	1	1
90					
91	2	3	2	1	1
92					
93	2		2	2	2
94					
95	2	4	2	1	1
96					
97	2		2	1	1
98					
99	2		2	1	1
100					
101	1	3	2	1	2
102					
103	2	2	2	1	1
104					
105					
106					
107	2	3	2	1	1
108					
109					
110					
113	2		2	1	1
114					
115	2		2	2	2
116					

laufende Nummer	Leukozyten 1=ja, 2=nein	Vermutliche Diagnose 1=akute Pilzi., 2=bakt. Vaginose, 3=CRVVC, 4=Bakt. Dysbiose	Schwangerschaft 1=ja, 2=nein	PA_Behandlung 1=ja, 2=nein	Regelmäßige PZR 1=ja, 2=nein
117					
118					
119	2	4	2	2	2
120					
121	2	3	2	1	1
122					
123	2	3,4	2	2	2
124					
125	2		2	1	1
126					
127	2		2	1	1
128					
129	2		2	1	1
130					
131	2		2	1	1
132					
133	2		2	2	2
134					
135	2	4	2	1	1
136					
137					
138					
139					
140					
141	2	3	2	2	2
142					
143					
144					
145	2	3	2	2	2
146					
147	2	3	2	1	1
148					
149	2		2	1	1
150					
151	2		2	1	1
152					
153	2		2	1	2
154					
155	2		2	2	1
156					
158	2	2,3	2	2	2
159					
160	2	3	2	2	2
161					
162	2	3	2	2	2
163					
164					
165					
166	2	3	2	2	2
167					
168	2	3	2	2	2
169					
170	2	3	2	2	2

laufende Nummer	Leukozyten 1=ja, 2=nein	Vermutliche Diagnose 1=akute Pilzi., 2=bakt. Vaginose, 3=CRVVC, 4=Bakt. Dysbiose	Schwangerschaft 1=ja, 2=nein	PA_Behandlung 1=ja, 2=nein	Regelmäßige PZR 1=ja, 2=nein
171					
172					
173					
174					
175					
176					
177					
178					
179					
180	2	3,4	2	2	2
181					
182	2	3	2	2	2
183					
184	2	3	2	2	2
185					
186	2	3	2	2	2
187					
188	2	2	1	2	2
189					
190	2	Harnwegsinfekt	2	2	1
191					
192	2	regelm. CR VVC	2	2	1
193					
194	2	früher 3	2	1	2
195					
196					
197					
198	2	3	1	2	2
199					
200	2		2	2	2
201					
202	2		1	2	1
203					
204	2	4	2	2	2
205					
206	2	3,4	2	2	2
207					
208	2	3	2	2	2
209					
210	2		2	2	1
211					
212	2	früher 3	2	2	1
213					
214	2	1,3	2	2	2
215					
216	2		1	2	1
217					
218	2		2	1	1
219					
220	2	1	2	2	2
221					
222	2	3	2	1	1
223					

laufende Nummer	Leukozyten 1=ja, 2=nein	Vermutliche Diagnose 1=akute Pilzi., 2=bakt. Vaginose, 3=CRVVC, 4=Bakt. Dysbiose	Schwangerschaft 1=ja, 2=nein	PA_Behandlung 1=ja, 2=nein	Regelmäßige PZR 1=ja, 2=nein
224	2	HPV	2	2	1
225					
226	2		2	2	1
227					
228					
229					
230	2		2	1	1
231					
232	2	2	2	2	1
233					
234	2	2	2	2	2
235					
236	2		2	2	2
237					
238					
239					
240	2		2	2	1
241					
242	2	3	1	2	1
243					
244					
245					
246	2	3	2	2	1
247					
248	2		2	2	2
249					
250	2		2	1	1
251					
252	2	3	2	1	1
253					
256	2	2,3	2	2	2
257					
258					
259					
260	2	3	2	2	2
261					
262	2	3	2	2	2
263					
264	2	3	2	2	2
265					
266	2		1	2	1
267					
268	2		1	1	1
269					
270	2		2	1	1
271					
272					
273					
276	2		2	1	1
277					
278	2		1	2	1
279					
280					

laufende Nummer	Leukozyten 1=ja, 2=nein	Vermutliche Diagnose 1=akute Pilzi., 2=bakt. Vaginose, 3=CRVVC, 4=Bakt. Dysbiose	Schwangerschaft 1=ja, 2=nein	PA_Behandlung 1=ja, 2=nein	Regelmäßige PZR 1=ja, 2=nein
281					
282	2		2	2	1
283					
284	2	2	2	2	1
285					
286	2		2	2	1
287					
288					
289					
290	2	2,4	2	2	2
291					
292	2	3	2	2	2
293					
294	2	3	2	2	2
295					
296	2	2,3	2	2	2
297					
298	2	3	2	2	2
299					
300					
301					
302	2	3	2	2	2
303					
304					
305					
306					
307					
308					
309					

laufende Nummer	Allergien aufführen	Magen-Darm-Probleme 1=ja, 2=nein	frühere Pilzerkrankungen 1=ja, 2=nein	Mundtrockenheit 1=ja, 2=nein	Mundgeruch 1=ja, 2=nein	Gesamt-Protein
1	?	1	1	1	1	1858,4
2						31,2
5		2	2	1	2	1845,0
6						43,1
8		2	2	2	1	838,0
9						846,8
12		2	2	2	2	1279,1
13						468,6
14		2	1	2	2	588,5
15						1071,4
16	HS, Pollen	1	1	2	2	1880,7
17						-23,9
18		2	1	2	2	2067,8
19						-31,8
21		2	2	2	2	1519,8
22						630,1
23		2	2	2	2	1430,6
24						519,8
25						1002,9
26						519,8
27		2	1	2	2	1537,6
28						275,5
29		2	2	2	2	1573,2
30						472,5
31		2	2	2	2	2032,2
32						346,4
35	Lebensmittel	2	1	2	2	637,5
36						-31,8
38		2	2	2	2	869,2
39						1063,5
40		2	2	2	2	1127,6
41						263,7
42		2	2	2	2	2491,2
43						429,2
44		2	2	2	2	1408,4
45						169,1
46		2	2	2	2	1310,3
47						177,0
48		2	2	2	2	820,2
49						11,5
51		2	2	2	2	1239,0
52						212,5
53		2	2	2	2	1898,5
54						346,4
55	Nickel	2	2	2	2	1301,4
56						216,4
57		2	2	2	2	249,8
58						90,3
59		2	2	2	2	1181,1
60						527,7
61		2	2	2	2	971,7
62						106,1
63	Sulframe	2	1	1	2	610,7

laufende Nummer	Allergien aufführen	Magen- Darm- Probleme 1=ja, 2=nein	frühere Pilzkrankungen 1=ja, 2=nein	Mundtrockenheit 1=ja, 2=nein	Mundgeruch 1=ja, 2=nein	Gesamt- Protein
64						82,5
65		2	1	2	1	811,3
66						15,5
67		2	2	2	2	757,8
68						1047,8
69		2	2	2	2	249,8
70						259,8
71		2	2	2	2	1684,6
72						787,7
73		2	2	2	2	1172,2
74						366,1
75	VSU rantine	2	2	2	2	1555,4
76						263,7
77		2	2	2	2	1613,3
78						1039,9
79	Pollen	2	1	2	2	2108,0
80						157,3
81		2	1	2	2	1029,6
82						169,1
83	Ja	2	2	2	2	249,8
84						523,7
85		2	2	2	2	1346,0
86						287,3
87		2	2	2	2	1452,9
88						551,3
89		2	2	2	2	1149,9
90						405,5
91		2	2	2	2	2219,4
92						405,5
93		2	2	2	2	249,8
94						-114,5
95		2	2	2	2	249,8
96						141,6
97		2	2	2	2	1778,2
98						397,7
99		2	2	2	2	249,8
100						74,6
101	Pollen	2	1	2	2	1314,8
102						141,6
103		2	2	2	2	2067,8
104						468,6
105						1359,3
106						437,1
107		2	2	2	2	1346,0
108						708,9
109						2353,0
110						401,6
113		2	2	2	2	1011,8
114						338,6
115		2	2	2	2	1270,2
116						712,9
117						1047,4
118						275,5
119		2	2	2	2	1025,1

laufende Nummer	Allergien aufführen	Magen-Darm-Probleme 1=ja, 2=nein	frühere Pilzerkrankungen 1=ja, 2=nein	Mundtrockenheit 1=ja, 2=nein	Mundgeruch 1=ja, 2=nein	Gesamt-Protein
120						-4,2
121	Diclo.	2	1	2	2	953,8
122						82,5
123	Penicillin	1	2	2	1	1194,5
124						-31,8
125		2	2	2	2	1190,0
126						665,6
127		2	2	2	2	3181,8
128						184,9
129		2	2	2	2	1038,5
130						125,8
131		2	2	2	2	1475,2
132						204,6
133		2	2	2	2	1822,8
134						712,9
135		2	2	2	2	980,6
136						318,9
137						1559,9
138						389,8
139						5053,4
140						681,3
141	Asthma	2	2	2	2	1359,3
142						535,6
143						2419,9
144						409,5
145		2	1	2	2	1969,8
146						1197,5
147		2	2	2	2	2718,4
148						823,2
149		2	2	2	2	1368,3
150						1043,8
151		2	2	2	2	1283,6
152						358,3
153		2	2	2	2	1452,9
154						519,8
155		2	1	2	2	1675,7
156						748,3
158		2	2	2	2	1399,4
159						539,5
160		2	1	1	2	1724,7
161						275,5
162		1	1	2	2	2116,9
163						381,9
164						2063,4
165						496,2
166	Lebensmittel	1	1	2	2	1234,6
167						196,7
168		1	1	2	2	1167,7
169						295,2
170		2	1	1	2	895,9
171						405,5
172						1493,0
173						334,6
174						249,8

laufende Nummer	Allergien aufführen	Magen-Darm-Probleme 1=ja, 2=nein	frühere Pilzkrankungen 1=ja, 2=nein	Mundtrockenheit 1=ja, 2=nein	Mundgeruch 1=ja, 2=nein	Gesamt-Protein
175						527,7
176						1016,2
177						342,5
178						1399,4
179						681,3
180	Ja	2	1	2	2	1698,0
181						192,8
182		2	1	2	2	1528,7
183						125,8
184		2	1	2	2	1221,2
185						31,2
186		2	1	2	2	2201,5
187						78,5
188		2	1	2	2	249,8
189						129,7
190		2	2	2	2	1127,6
191						255,8
192		2	1	2	2	2994,7
193						232,2
194		2	1	2	2	1181,1
195						693,2
196						1689,1
197						244,0
198		2	1	2	2	1279,1
199						417,4
200		2	2	2	2	971,7
201						283,4
202		1	1	1	1	1372,7
203						200,7
204	Ja	1	1	2	2	1051,9
205						492,2
206	Penicillin	2	1	2	2	2210,4
207						338,6
208		2	1	2	2	1506,4
209						267,6
210	Heuschnupfen	2	1	2	2	1350,4
211						614,4
212	Ja	2	2	2	2	1190,0
213						760,1
214	Pollen, LM	1	1	2	2	249,8
215						393,7
216	Ja	2	1	2	2	1038,5
217						149,4
218	Jod	1	2	2	2	1016,2
219						480,4
220	Ja	2	1	2	2	855,8
221						244,0
222	Ja	1	1	2	2	1047,4
223						200,7
224		2	1	1	1	1359,3
225						437,1
226		2	2	2	2	985,0
227						279,5
228						1323,7

laufende Nummer	Allergien aufführen	Magen- Darm- Probleme 1=ja, 2=nein	frühere Pilzkrankungen 1=ja, 2=nein	Mundtrockenheit 1=ja, 2=nein	Mundgeruch 1=ja, 2=nein	Gesamt- Protein
229						228,2
230		2	2	2	2	1051,9
231						74,6
232		2	1	2	1	953,8
233						62,8
234	Ja	2	2	2	2	780,1
235						110,0
236	Penicillin	1	1	2	2	249,8
237						291,3
238						249,8
239						299,2
240	Ja	2	1	2	2	1154,4
241						858,6
242		2	2	1	2	1952,0
243						303,1
244						1181,1
245						2253,4
246	Penicillin u.a.	1	1	2	2	1319,2
247						181,0
248		2	1	2	2	1680,2
249						240,1
250	viele	2	2	2	2	838,0
251						464,6
252		2	1	2	2	1484,1
253						307,0
256		1	1	2	2	1239,0
257						326,7
258						1631,2
259						307,0
260		2	1	2	2	878,1
261						433,1
262	Jod u.a.	2	1	2	2	1056,3
263						236,1
264	Nickel u.a.	2	1	2	2	1007,3
265						192,8
266	Ja	2	2	2	2	1123,2
267						472,5
268	Ja	2	1	1	2	1555,4
269						389,8
270	Ja	2	2	2	2	2553,6
271						437,1
272						2018,8
273						693,2
276		1	1	1	2	1889,6
277						1339,3
278	Ja	1	1	1	2	249,8
279						192,8
280						775,6
281						133,7
282	Ja	2	2	2	2	1149,9
283						488,3
284	Ja	1	1	2	2	2148,1
285						27,3
286	Ja	2	1	2	2	606,3

laufende Nummer	Allergien aufführen	Magen- Darm- Probleme 1=ja, 2=nein	frühere Pilzerkrankungen 1=ja, 2=nein	Mundtrockenheit 1=ja, 2=nein	Mundgeruch 1=ja, 2=nein	Gesamt- Protein
287						3,7
288						2976,9
289						575,0
290		1	1	2	2	740,0
291						70,6
292		2	1	2	2	2085,7
293						74,6
294		2	2	2	2	673,1
295						236,1
296		2	1	2	2	1065,2
297						5054,7
298		2	1	2	2	1154,4
299						799,5
300						1141,0
301						232,2
302		2	2	2	2	1038,5
303						358,3
304						1136,5
305						606,5
306						2500,1
307						708,9
308						249,8
309						515,9

8 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. E. R. Weissenbacher für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas, für die wertvollen Anregungen im Verlauf der Anfertigung und die durchgehende Beratung und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. H. Spitzbart danke ich für die fachliche Beratung und Korrektur zu Beginn der Anfertigung des Manuskriptes und seine hilfreiche Unterstützung beim experimentellen Teil der Dissertation.

Frau Dr. Stephanie Schwarz möchte ich für ihre stete Beratung und wertvolle Zusammenarbeit danken.

Frau Christine Kügler danke ich für die geduldige und ausdauernde Unterstützung bei allen Fragen der Formatierung und Gestaltung.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Vorname: Victor Frank
Nachname: Schardt
Geburtsdatum: 04.10.1973
Geburtsort: München
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Adresse: Tal 23
80331 München
e-Mail: VictorSchardt@web.de

Schul Ausbildung

1980 – 1984 Michael-Ende-Grundschule Unterschleißheim
1984 – 1993 Carl-Orff-Gymnasium Unterschleißheim
Abiturnote: 1,3

Zivildienst

1993 – 1994 Heilpädagogisches Zentrum Augustinum

Studium

1994 – 2001 Studium der Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
Vorphysikumsnote: 1,6
Physikumsnote: Gut
2001 – 2002 Studium der Zahnmedizin an der Universität Carl-Gustav-Carus, Dresden
Staatsexamensnote: Gut
Zahnärztliche Approbation

Beruflicher Werdegang

2003	Februar – September Vorbereitungsassistent Praxis Dr. Eisenburger, Schwabmünchen
2003	Oktober – September 2005 Vorbereitungsassistent Praxis Dres. Rohr, München
Seit 2006	Niedergelassen in eigener Gemeinschaftspraxis in der Münchner Altstadt